

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SISTEMÁTICA DEL COMPLEJO *Pristimantis conspicillatus* y *Pristimantis peruvianus*
(ANURA: CRAUGASTORIDAE)

Tesis previa a la obtención del título de Magister en Biología de la Conservación

TERESA CAMACHO BADANI

Quito, 2013

Certifico que la Tesis de Maestría en Biología de la Conservación de la candidata Teresa Camacho Badani ha sido concluída de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Santiago R. Ron

Director de la Tesis

Mayo de 2013

Dedicado a la memoria de mi hermano Andrés.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Teresa y Rolando, mis hermanos Pablo, Diego y Ximena a quienes agradezco por su cariño, apoyo y comprensión.

A Santiago R. Ron, director de la disertación, por sus enseñanzas, el apoyo y confianza durante el desarrollo de esta investigación. De la misma manera a Omar Torres y Roberto Ulloa por sus sugerencias y consejos.

A Pablo Venegas del Instituto CORBIDI, Freddy Navarro del Centro de Biodiversidad y Genética de la Universidad Mayor de San Simón, Claudia Cortez, Arturo Muñoz del Museo de Historia natural Alcide d'Orvigni por la colaboración y préstamo de tejidos utilizados. También agradezco a Morley Read y Mario Yáñez-Muñoz por la colaboración con grabaciones de cantos. Por las enseñanzas en el laboratorio de biología molecular quiero agradecer a María Eugenia Ordonez, Diana Flores y Andrea Manzano.

Al Programa de becas de la Organización de Estados Americanos por la concesión de una beca de Postgrado.

la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al Museo de Zoología QCAZ y al proyecto PIC 08-0470 “Inventario y caracterización genética y morfológica de la diversidad de reptiles, aves y anfibios de los Andes del Ecuador”, financiado por el SENESCYT, por el soporte económico este estudio.

Todos los amigos que hice durante este tiempo, Natalia Sáenz, Ana Troya, Ana Charpentier, Pilar Rodríguez, Lorena Rodríguez, Nadia López, Diana Pazmiño, Daniela Pareja, Paloma Lima, Pablo Menéndez, Paulina Santiana, Damian Nicolalde, Mario Yáñez

y a toda la gente linda del Museo de Zoología QCAZ de la división de herpetología,
muchas gracias por acompañarme a lo largo de este tiempo en Ecuador.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. GRUPO DE ESTUDIO.....	7
3.1.1. GRUPO DE ESPECIES <i>Pristimantis conspicillatus</i>	7
3.1.2. GRUPO DE ESPECIES <i>Pristimantis peruvianus</i>	8
3.1.3. HISTORIA TAXONÓMICA.....	9
3.2. IMPORTANCIA PARA LA CONSERVACIÓN.....	12
3.3. OBJETIVOS.....	13
3.3.1. OBJETIVOS GENERALES.....	13
3.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1. ESPECIES ESTUDIADAS.....	14
4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	14
4.2.1. MUESTREO DE TAXA.....	14
4.2.2. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN.....	15
4.2.3. ENSAMBLE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE ADN.....	15
4.2.4. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA.....	16
4.2.5. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	17
4.2.6. ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA.....	18

4.3. CANTOS DE ANUNCIO.....	19
4.4. ESPECIES CANDIDATAS E IDENTIDAD TAXONÓMICA DE <i>P.</i> <i>conspicillatus</i>	20
4.5. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y PRIORIDADES DE CONSERVACIÓN.	21
4.6. FICHAS INFORMATIVAS.....	22
5. RESULTADOS.....	22
5.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	22
5.1.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA Y MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	23
5.1.2. ESTIMACIONES DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA.....	27
5.2. CANTOS DE ANUNCIO.....	28
5.3. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y PRIORIDADES DE CONSERVACIÓN.....	29
5.4. SINOPSIS INFORMATIVAS.....	30
6. DISCUSIÓN.....	30
6.1. FILOGENÉTICA Y SISTEMÁTICA.....	30
6.2. TIEMPOS DE DIVERGENCIA.....	36
6.3. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y PRIORIDADES DE CONSERVACIÓN.....	39
6.4. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN.....	42
7. CONCLUSIONES.....	44

8. RECOMENDACIONES.....	45
9. LITERATURA CITADA.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa del área de estudio mostrando las localidades de <i>Pristimantis</i>	68
Figura 2.	Filograma consenso de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud representando las relaciones dentro del grupo de especies <i>P. conspicillatus</i> y <i>P. peruvianus</i> . Para 4013 pb de genes mitocondriales (12S, 16S, tRNA-Val y COI) y un gen nuclear (RAG1).....	69
Figura 3.	Filograma consenso de Inferencia Bayesiana (IB) representando las relaciones dentro del grupo de especies <i>P. conspicillatus</i> y <i>P. peruvianus</i> . El Filograma se deriva del análisis de 267 taxa, 3332 pb de genes mitocondriales (12S, 16S, tRNA-Val y COI)	73
Figura 4.	Filograma consenso de Inferencia Bayesiana representando las relaciones dentro del grupo de especies <i>P. conspicillatus</i> y <i>P. peruvianus</i> . El Filograma deriva del análisis de 648 pb del gen nuclear RAG1 con 3 particiones.....	77
Figura 5.	Mapa de distribución de los individuos analizados para el grupo de especies <i>P. peruvianus sensu</i> Hedges <i>et al.</i> , 2008)	79
Figura 6.	Especies de los grupos <i>Pristimantis conspicillatus</i> y <i>P. peruvianus</i> incluidos en el presente trabajo..	80
Figura 7.	Mapa de distribución de los individuos analizados en el presente trabajo para el grupo de especies <i>P. affinis</i>	81

Figura 8.	Mapa de distribución de los individuos utilizados en el presente trabajo de las especies del Clado A.....	82
Figura 9.	Mapa de distribución de los individuos utilizados en el presente trabajo de las especies del Clado B.....	83
Figura 10.	Mapa de distribución de las especies utilizadas en el presente trabajo para el Clado C. trabajo para el Clado C.	84
Figura 11.	Mapa de distribución de los individuos utilizados en el presente trabajo de las especies del Clado D.....	85
Figura 12.	Mapa de distribución de las especies del complejo <i>P. conspicillatus</i> utilizados en el presente trabajo (Clado E).....	86
Figura 13.	Cronograma derivado de un análisis de Inferencia Bayesiana con una calibración de 57Ma (Heinike <i>et al.</i> , 2007)	87
Figura 14.	Proyección de las variables acústicas sobre los CP1 (principalmente tiempo de subida y duración del canto) y CP2 (principalmente frecuencia dominante y frecuencia fundamental) del complejo de especies <i>P. conspicillatus</i>	88
Figura 15.	Árbol filogenético de 58 especies del grupo de especies <i>Pristimantis conspicillatus</i> y <i>P. peruvianus</i> . Prioridad de conservación en base a la distinción evolutiva (ED).	89
Figura 16.	Árbol filogenético de 58 especies del grupo de especies <i>Pristimantis conspicillatus</i> y <i>P. peruvianus</i> . Prioridad de conservación en base a la distinción evolutiva de los clados (EDc).	90

Figura 17.	Fotos del holotipo de <i>Pristimantis conspicillatus</i>	91
Figura 18.	Mapa de la primera expedición de Luis Fraser a los Andes de Ecuador.....	92
Figura 19.	Fotos de <i>Pristimantis conspicillatus sensu stricto</i>	93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Especie, autor y grupo de especies utilizadas para los análisis moleculares en el presente estudio	95
Tabla 2.	Numero de museo, especie, coordenadas, números de acceso del GenBank y secuencias adicionales incluidas en este estudio.....	96
Tabla 3.	Cebadores utilizados en el presente estudio.....	116
Tabla 4.	Modelos de substitución obtenidos para cada partición utilizada en los análisis filogenéticos.....	117
Tabla 5.	Variables acústicas de los cantos de anuncio utilizadas en el presente trabajo para <i>P. conspicillatus sensu lato</i>	118
Tabla 6.	Estimación de los tiempos de divergencia evolutiva para el grupo de especies <i>P. conspicillatus</i> y <i>P. Peruvianus</i>	119
Tabla 7.	Medidas de Prioridades de Conservación, en base a la Distinción Evolutiva (ED) y la Distinción Evolutiva de los clados (EDc).....	120

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Protocolo Tiocinato-Guanidina utilizado para la extracción de ADN con modificaciones realizadas en el laboratorio de biología molecular de la división de Herpetología del QCAZ.....	124
Anexo 2.	Protocolos de PCR. la temperatura es en grados centígrados y el tiempo se encuentra en segundos.....	126
Anexo 3.	Descripción de <i>Pristimantis conspicillatus</i> traducido de Günther, 1858.....	127
Anexo 4.	Expedición de Luis Fraser en Ecuador	128

1. RESUMEN

Entre los vertebrados, el género *Pristimantis* es el más diverso del planeta. Su gran variedad fenotípica intra e inter poblacional y la escasa diferenciación morfológica entre especies los han hecho notorios por la complejidad de sus problemas taxonómicos. A esto se suman las incompletas e imprecisas descripciones de los taxa. En este trabajo se estudió la taxonomía y las relaciones evolutivas de las ranas del grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus* desde el punto de vista de la taxonomía integrativa. El objetivo final fue explorar los factores que han promovido su especiación. Para esto, se realizaron Análisis Filogenéticos (Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud) basados en tres genes mitocondriales (12S, 16S, COI) y un gen nuclear (RAG1) para 267 terminales. Adicionalmente se analizaron cantos de anuncio de cinco poblaciones del grupo de especies *P. conspicillatus*. Tiempos de divergencia fueron estimados y se llevó a cabo un análisis de distinción evolutiva para determinar las especies con mayor prioridad de conservación. Sinopsis informativas de las especies ecuatorianas fueron publicadas en el portal AmphibiaWebEcuador.

Los análisis de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud mostraron topologías similares en las cuales los grupos de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus* tuvieron gran diversidad críptica. Se encontraron cuatro nuevas especies confirmadas y 22 especies candidatas no confirmadas en el grupo interno. El clado que incluye a *P. conspicillatus sensu lato* es un complejo con cuatro especies candidatas confirmadas y tres especies candidatas no confirmadas en el grupo interno. La filogenia muestra que el grupo de especies *P. peruvianus* ha sido incorrectamente definido ya que su designación se basó en una identificación incorrecta. El grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus* divergen durante el Oligoceno, en ambos grupos la mayor diversificación ocurrió en el Mioceno y los eventos de

especiación mas recientes sucedieron en el grupo de especies *P. conspicillatus* durante el Plioceno y Pleistoceno. El análisis de Distinción evolutiva muestra que una especie aún no descrita de Brasil y *P. caprifer* de Ecuador y Colombia fueron las de mayor prioridad de conservación.

Palabras clave: Andes, cantos de anuncio, distinción evolutiva, filogenética, *Pristimantis conspicillatus*, *Pristimantis peruvianus*, taxonomía integrativa.

2. ABSTRACT

Among vertebrates, the genus *Pristimantis* is the most diverse of the planet. The great phenotypic variation within and between populations and the low morphological differentiation between species have made them notorious by the complexity of their taxonomic problems. In addition, taxa descriptions are incomplete and imprecise. In this work, I studied the taxonomy and evolutionary relationships of frogs of the *P. conspicillatus* and *P. peruvianus* species groups using integrative taxonomy. The final aim was to explore the factors that may have promoted their speciation. Phylogenetic analyses (Bayesian Inference and Maximum Likelihood) based on three mitochondrial genes (12S, 16S, COI) and one nuclear gene (RAG1) for 267 terminals were made. I also analyzed advertisement calls from five populations of the *P. conspicillatus* species group. Times of divergence were estimated and an analysis of evolutionary distinction was carried out to determine the species with more conservation priority. Species accounts for the Ecuadorian species were published in the website AmphibiaWebEcuador.

The Bayesian Inference and Maximum Likelihood analyses showed trees with similar topologies where the species groups *P. conspicillatus* and *P. peruvianus* had high cryptic diversity. I found four confirmed and 22 unconfirmed candidate species in the ingroup. The phylogeny indicates that the name of the group of species *P. peruvianus* has been incorrectly applied since its assignment was based on an incorrect identification. The groups *P. conspicillatus* and *P. peruvianus* diverged during the Oligocene, in both groups the greatest diversification occurred during the Miocene and the most recent speciation events in the *P. conspicillatus* group took place during the Pliocene and Pleistocene. The evolutionary

distinctiveness analysis showed that an undescribed species from Brazil and *P. caprifer* from Ecuador and Colombia have the highest conservation priority.

Key words: Andes, evolutionary distinctiveness, integrative taxonomic, phylogenetics
Pristimantis conspicillatus, *Pristimantis peruvianus*.

3. INTRODUCCIÓN

La filogenética y la biología de la conservación son dos ramas de la biología que han tenido un rápido crecimiento en las últimas dos décadas (Purvis *et al.*, 2005). La introducción de una nueva gama de herramientas como el secuenciamiento de ADN y los nuevos métodos para su análisis han llevado a la descripción de nuevas especies (e.g. Köhler, 2000; Padial y De la Riva, 2009), la revisión de hipótesis filogenéticas (e.g. Frost *et al.*, 2006; Hedges *et al.*, 2008; Pyron y Wiens, 2011, Canedo *et al.*, 2012) o reconstrucción de tiempos de divergencia evolutiva y sus relaciones filogenéticas (Heinike *et al.*, 2007; Roelants *et al.*, 2007; Wiens, 2007; Wiens *et al.*, 2011; Pinto-Sánchez *et al.*, 2012).

En muchos casos el desarrollo de la filogenética no ha estado acompañado de un desarrollo similar de la taxonomía descriptiva básica (Wheeler, 2004; Wheeler *et al.*, 2004), en ocasiones la posición de un organismo en una filogenia es una de las pocas cosas que se sabe con precisión acerca de las especies (Mace *et al.* 2003); sin embargo esto está cambiando ya que cada vez son más las descripciones de especies que incluyen marcadores genéticos e incluso propuestas de relaciones filogenéticas (e.g. Ron *et al.*, 2006; Funk *et al.*, 2011).

A medida que las amenazas para la biodiversidad aumentan, la biología de la conservación se ha enfocado en un planeamiento sistemático como el establecimiento de prioridades, monitoreos de las tendencias poblacionales y evaluación de la biodiversidad. Cada vez es más frecuente que los biólogos de la conservación se ocupen de taxones cuya historia natural o incluso su identidad taxonómica es poco conocida (Purvis *et al.*, 2005). Tener claro los límites de una especie es primordial para poder tomar decisiones acertadas en el momento de priorizar y conservar especies.

Las ranas de desarrollo directo de la familia Craugastoridae contienen aproximadamente 601 especies (Amphibiaweb, 2013) de las cuales el género *Pristimantis* (Jiménez de la espada, 1870) es el más diverso con alrededor de 455 especies (Duellman y Lehr, 2009), lo que lo convierte en el género de vertebrados más especioso del planeta (Young *et al.*, 2004). Este género presenta abundantes problemas taxonómicos debido a su dificultad de identificación, tanto en el campo como en el laboratorio. Esto parece deberse a la alta variabilidad fenotípica intra e interpoblacional y a la escasa diferenciación morfológica entre especies (Padial *et al.*, 2009; Crawford y Smith, 2005). A esto se suman las incompletas y/o imprecisas descripciones de las especies (Duellman y Lehr, 2009).

Las ranas *Pristimantis* han sido agrupados en unidades Infragenéricas y grupos de especies. En 1976, Lynch unifica las clasificaciones de estudios previos y en base a caracteres principalmente morfológicos describe 10 grupos principalmente sudamericanos que en algunos casos llegaban hasta Centroamérica como en el caso del grupo *fitzingeri* con 22 especies. Estos grupos de especies se hicieron cada vez más grandes al pasar del tiempo, en algunos casos llegaron a ser demasiado numerosos (Lynch y Duellman, 1997). Lynch y Duellman (1980) sugirieron usar subdivisiones dentro de los grupos, los cuales fueron reconocidos finalmente como grupos de especies.

Hedges (2008) propone una filogenia molecular de las ranas de desarrollo directo del nuevo mundo (Anura, Terrarana), realiza una clasificación y menciona datos de biogeografía y conservación. En el caso del género *Pristimantis* propone 16 grupos de especies divididos en tres subgéneros (*Pristimantis*, *Hypodyctyon* y *Yunganastes*). Los grupos de especies son vistos como unidades tentativas entre subgénero y especie hasta que su monofilia se pueda probar. El presente estudio pretende identificar las relaciones evolutivas de las ranas *Pristimantis* del grupo *conspicillatus* y del grupo *P. peruvianus*.

3.1 GRUPO DE ESTUDIO

El presente trabajo se centra en las especies de dos grupos de especies cercanamente relacionados, *Pristimantis conspicillatus* y *Pristimantis peruvianus*. Los siguientes recuentos se basan en Hedges *et al.* (2008) a no ser que se especifique lo contrario.

3.1.1 GRUPO DE ESPECIES *Pristimantis conspicillatus*

Las ranas de este grupo son de tamaño moderado a grande con un rango de longitud rostro-cloaca (LRC) de 19 mm en machos de *P. skydmainos* hasta 72.9 mm en machos de *P. lymani*. Sus patas traseras son proporcionalmente largas. El ancho de la cabeza es 30–43% de la LRC y la longitud de la pierna 45–64% de la LRC. Las crestas craneales están ausentes y la membrana timpánica y el anillo timpánico son evidentes. El dorso puede ser liso o rugoso, con pliegues dorsolaterales que pueden estar presentes o ausentes. El vientre por lo general es liso, pero excepcionalmente puede ser ligeramente granular (areolado). Los dedos de los pies en la mayoría de los casos presentan membrana basal, el dedo V es ligeramente más largo que el III y el pliegue tarsal interno puede estar presente o ausente. Rebordes cutáneos en los dedos de las extremidades anteriores y posteriores pueden estar presentes o ausentes, en los machos las hendiduras vocales por lo general están presentes. Los patrones de coloración son variables pero una máscara oscura en el rostro y un patrón dorsal con dos a tres manchas en forma de V invertida son comunes. En general son especies terrestres pero pueden ascender a vegetación baja durante la noche.

Se distribuyen en el norte de Sudamérica y la Amazonía, desde Colombia hacia las Guayanas Francesas y la Isla de Taboga; una especie llega al norte en Costa Rica y algunas

especies llegan al sur hasta Bolivia. Este grupo se encuentra restringido a tierras bajas y estribaciones en los Andes.

Hedges *et al.* (2008) incluyó 37 especies en el grupo, sin embargo durante los últimos años se han descrito o reasignado nuevas especies para el grupo (e.g. Padial *et al.*, 2009; Canedo y Haddad, 2012) por lo que en la actualidad cuenta con 44 especies.

3.1.2 GRUPO DE ESPECIES *Pristimantis peruvianus*

Las especies del grupo *Pristimantis peruvianus* se caracterizan por tener un tamaño pequeño a moderado, LRC de 15.7 mm en machos de *P. peruvianus* a 48.5 mm en machos de *P. danae*. Extremidades posteriores y brazos proporcionalmente largos, el ancho de la cabeza es 39.44% del LRC y el largo del muslo de 49 a 70% de la LRC. Crestas craneales ausentes, la membrana y el anillo timpánico son evidentes y una mascara facial oscura está presente en algunas especies. El dorso es liso o rugoso, con pliegues dorsolaterales que pueden estar presentes o ausentes; el vientre es generalmente liso pero especies como *P. danae*. *P. pharangobates*, *P. rhabdolaemus*, *P. sagittulus*, *P. stictogaster* y *P. toftae* tienen el vientre areolado, los machos presentan sacos vocales evidentes. Las patas traseras generalmente no presentan membrana entre los dedos, incluso basalmente, el dedo V del pie es ligeramente más largo que el dedo III y el pliegue tarsal interno que puede estar presente o ausente. Pueden presentar o no rebordes cutáneos tanto en las extremidades anteriores como en las posteriores. El patrón dorsal es variable, pero dos o tres marcas en forma de V invertida se han reconocido en varias especies. Son terrestres aunque algunas de ellas se encuentran en vegetación baja.

Se distribuyen en bosques húmedos de la vertiente amazónica de los Andes y en la Cuenca del Amazonas en Ecuador, Perú y Bolivia; dos especies (*P. crepitans* y *P. dundeei*) habitan en los bosques y matorral seco en el Mato Grosso al suroeste Brasil.

Hedges *et al.* (2008) incluyó 15 especies en la descripción del grupo; a la fecha se ha adicionado una especie *P. reichlei* (Padial *et al.*, 2009), que en su descripción fue asignada al grupo *P. unistrigatus* pero a partir de la filogenia presentada por Pyron y Wiens (2011) se muestra la cercana relación con el grupo *P. peruvianus*.

3.1.3 HISTORIA TAXONÓMICA

La primera clasificación de los *Pristimantis* sudamericanos fue propuesta por Cochran y Goin (1970); quienes dividen a los en ese entonces *Eleutherodactylus* en cuatro grupos presentes en Colombia; los miembros del actual grupo *P. conspicillatus* se encontraban en el grupo I por presentar el vientre y la cabeza lisas, la ausencia de crestas craneales, patas largas y un considerable tamaño.

Lynch (1976) al comparar datos de las descripciones originales y examinar el material tipo de una gran cantidad de especies de *Pristimantis*, notó una coincidencia general en ciertos estados de caracteres. Gran parte de las especies sudamericanas del género presentaban el primer dedo de la mano más corto que el segundo y la piel del vientre areolada; por lo que en función a estas características (primer dedo más largo que el segundo / primer dedo más corto que el segundo y la textura de la piel del vientre lisa, débilmente areolada o fuertemente areolada) propuso cuatro combinaciones de estos caracteres: (1A) Primer dedo de la mano más largo que el segundo, piel del vientre lisa o ligeramente granular; (1B) Primer dedo de la manos más largo que el segundo, piel del vientre areolada; (2A)

Primer dedo de la mano más corto que el segundo, piel del vientre lisa; (2B) Primer dedo de la mano más corto que el segundo, piel del vientre areolada.

Se nombraron 10 grupos de especies dentro de las cuatro unidades infragenéricas; sin embargo las cuatro combinaciones de caracteres (1A, 1B, 2A, 2B) son consideradas solo como subdivisiones convenientes y no necesariamente los grupos dentro de ellas están más relacionadas entre si que con otros grupos (Lynch, 1976). Dentro del grupo 1A se encuentra el grupo de especies *P. fitzingeri* definido por presentar la cabeza estrecha, ausencia de crestas craneales, dígitos con discos evidentes, membrana entre los dedos de los pies, que puede ser basal completa o estar ausente. Entre las 21 especies que conformaron este grupo, se incluían especies del los actuales grupo *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*.

El grupo de especies *P. fitzingeri* fue creciendo, Lynch y Myers (1983) realizan una revisión del grupo, adicionan 40 especies más y ponen en duda la monofilia del grupo debido a que comparaciones con grupos externos muestran que los caracteres que lo definen son plesiomórficos.

Lynch y Duellman (1997) crean siete series de especies, las cuales son consideradas como una categoría entre subgénero y grupo de especies, y son utilizadas como un arreglo temporal hasta que los subgéneros puedan ser diagnosticados eficientemente. En este estudio dividen al grupo de especies *Pristimantis fitzingeri*, crean el grupo de especies “*Eleutherodactylus*” *conspicillatus* dentro de la serie de especies *Pristimantis conspicillatus*. Para esto se basan principalmente en las siguientes características morfológicas: ranas pequeñas a grandes (en hembras de 25–75 mm de longitud rostro-cloaca), cabeza estrecha, hocico largo, crestas craneales ausentes; párpado superior estrecho, cuerpo esbelto, piernas relativamente largas, vientre liso (areolado en *P. caprifer*); odontóforos vomerinos grandes y

triangulares; hendiduras vocales generalmente presentes, almohadillas nupciales generalmente presentes; membrana timpánica y anillo timpánico presentes, relativamente grandes; sin dimorfismo sexual en el tamaño, discos de los dedos expandidos; primer dedo de la mano más largo que el segundo; tubérculos subarticulares; borde interior del tarso con un pliegue corto en muchas especies; dedo V del pie ligeramente más largo que el dedo III y sin membrana entre los dedos de los pies (basal en algunas especies).

Para Lynch y Duellman, (1997) el grupo no parecía ser monofilético ya que entre las 29 especies asignadas, *P. Caprifer*, al contrario de los otros miembros, presenta vientre areolado y el primer dedo de la mano más corto que el segundo. Además, la aparente poca relación de *P. gaigei* al grupo hacía que la monofilia esté en duda.

Hedges *et al.* (2008) apoyado en su filogenia molecular dividió a las más de 50 especies del grupo *P. conspicillatus* (*sensu* Lynch y Duellman, 1997) en dos: el grupo de especies *P. conspicillatus* con 37 especies y el grupo de especies *P. peruvianus* con 14 especies. Ambos grupos se encuentran cercanamente relacionados. Los resultados de la filogenia de Hedges *et al.* (2008) no fueron concluyentes debido al soporte obtenido entre los dos clados era bajo; por lo que deciden no crear un taxón más alto (serie o subgénero) a pesar de que ambos grupos de especies por separado son los que presentan mejor soporte dentro del subgénero *Pristimantis*.

Estudios posteriores como el de Pyron y Wiens (2011), Pinto-Sánchez *et al.* (2012) y Canedo y Haddad (2012) muestran como hermanos a los grupos *P. peruvianus* y *P. conspicillatus* aunque con un bajo soporte; coinciden en la monofilia con alto soporte del grupo *P. peruvianus* y al grupo *P. conspicillatus* como parafilético ya que *P. caprifer* y *P. savagei* de este grupo, forman un clado separado con especies del grupo *P. unistrigatus* como

P. shrevei y *P. euphronides*.

3.2 IMPORTANCIA PARA LA CONSERVACIÓN

Tradicionalmente, las unidades de conservación en biología han sido las especies (Agapow *et al.*, 2004). Tener claro la identidad taxonómica de estas es el primer paso para poder conservarlas, mas aún tomando en cuenta que los planes de manejo se suelen enfocar en especies en particular y en el momento de comparar biodiversidad las unidades son las especies (e.g. número de especies en un área, cantidad de especies amenazadas, etc.). En anfibios entre el 86 y 89% de las declinaciones son causadas por la pérdida del hábitat (Young *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2008). Especies que contienen diversidad críptica pueden contener linajes de distribución limitada y por lo tanto propensos a la extinción (Bickford, 2007). Por ello, es preciso determinar adecuadamente los límites entre las especies.

Para conservar la biodiversidad, es necesario no sólo identificar especies y maximizar el número de taxones que se salven hoy en día sino también garantizar el mantenimiento de altos niveles de diversidad biológica en el futuro (Vázquez y Gittleman, 1998). La filogenética no solo ayuda a resolver problemas taxonómicos sino que también es una herramienta muy importante en términos de conservación, ya que permite aclarar las delimitaciones de especie, presenta nuevas unidades de conservación como unidades evolutivas significativas (Avise, 2000), o distinciones filogenéticas de conservación en el caso de clados únicos (Faith, 1992). Es por esto que los análisis filogenéticos proporcionan información evolutiva importante (Fouquet *et al.*, 2012), comprender los mecanismos que generan diversidad es esencial si se quiere salvaguardar su futuro, a través de la conservación de los procesos evolutivos, así como el patrón que los ha producido (Avise, 2000).

Por la cercana relación filogenética que presentan el grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus* (Heinike *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Pinto-Sánchez *et al.*, 2012; Canedo y Haddad, 2012) hemos decidido estudiar a ambos en el presente trabajo, inferir sus relaciones evolutivas, explorar los factores y procesos que han podido influenciar en su especiación y estimar las prioridades de conservación en relación a su distinción evolutiva.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVOS GENERALES

- Inferir las relaciones evolutivas de ranas *Pristimantis* de los grupos *Pristimantis conspicillatus* y *Pristimantis peruvianus*.
- Explorar los factores y procesos que han podido influenciar en la especiación de las ranas del grupo *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los límites entre especies y determinar la identidad taxonómica de los linajes evolutivos del grupo *Pristimantis conspicillatus* y *P. peruvianus* desde el punto de vista de taxonomía integrativa.
- Proponer una filogenia del grupo *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*.
- Estimar el tiempo de divergencia evolutivo para el grupo de especies *P.*

conspicillatus y *P. peruvianus*.

- Calcular las prioridades de conservación de las especies estudiadas en función de su distinción evolutiva.
- Elaborar fichas informativas de las especies de ambos grupos presentes en Ecuador.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESPECIES ESTUDIADAS

Se incluyeron en los análisis especies de los grupos *Pristimantis conspicillatus* (21 especies), *P. peruvianus* (9 especies) y especies del grupo *unistrigatus* (cuatro especies) cercanamente relacionadas (Tabla 1), para un total de 226 individuos, además de 41 individuos como grupo externo. Por otro lado se realizaron análisis de cantos de anuncio de las especies con grabaciones disponibles o que se pudieron obtener en campo.

4.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

4.2.1 MUESTREO DE TAXA

Se obtuvieron nuevas secuencias de ADN a partir de muestras de tejido depositadas en el banco de genoma del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Centro de Ornitología y Biodiversidad (CORBIDI) de Perú, del Centro de Biodiversidad y Genética (CBG) de la Universidad Mayor de San Simón en Bolivia y del Museo de Historia Natural Alcide d'Orbigny en Bolivia (Fig. 1). También se incluyeron las secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 2).

4.2.2 EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN

El ADN fue extraído de músculo o tejido hepático conservado en alcohol al 95%. El método usado para la extracción de ADN fue el protocolo de Tiocinato-Guanidina (Anexo 1) con modificaciones realizadas en el Laboratorio de biología molecular de la división de Herpetología del QCAZ.

Posteriormente, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se procedió a la amplificación de los genes mitocondriales 12S rRNA; 16S rRNA; el gen intermedio tRNA-Val; un fragmento del gen Citocromo Oxidasa 1 (COI) y un fragmento del gen nuclear activador de recombinación (Rag1). Los cebadores (Tabla 3) y protocolos (Anexo 2) para la amplificación de los genes se basaron en los trabajos de Heinike, *et al.* (2007); Hedges *et al.* (2008), Pinto-Sánchez *et al.* (2012) y protocolos estandarizados en el Laboratorio de biología molecular de la división de Herpetología del QCAZ.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0,1%. Las muestras amplificadas fueron purificadas de residuos de cebadores y dNTPs no incorporados con el Kit ExoSap-IT. Una vez purificados, los productos de PCR fueron enviados al laboratorio MacroGen (MacroGen Inc., Seúl, Corea) para su secuenciamiento.

4.2.3 ENSAMBLE , EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE ADN

Las secuencias obtenidas se ensamblaron para formar una secuencia consenso en el programa Geneious Pro v.5.4.2 (Drummond *et al.*, 2010). Estas y otras secuencias obtenidas del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) se alinearon con ayuda de la

herramienta Geneious Aligner el cual tiene implementado un algoritmo de alineamiento progresivo en pares, exclusivo del Programa Geneious.

Adicionalmente se utilizó el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011) para revisar las alineaciones, en el caso de ser necesaria la alineación de algún fragmento de la matriz, se utilizó la extensión Muscle Alignment v. 3.8.1 (Edgar, 2004).

4.2.4 ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA

La Inferencia Bayesiana (IB) se hizo en el programa MrBayes v.3.2.1 (Huelsenbeck *et al.*, 2008). Se realizaron dos tipos de partición de las secuencias, una sola partición y nueve particiones: (1) gen 12S, (2) gen intermedio de transferencia tRNA-val, (3) gen 16S, (4) primera posición de los codones del gen CO1, (5) segunda posición de los codones del gen CO1, (6) tercera posición de los codones del gen CO1 (7) primera posición de los codones del gen RAG1, (8) segunda posición de los codones del gen RAG1 y (9) tercera posición de los codones del gen RAG1. Adicionalmente se realizaron análisis separados para los genes mitocondriales (12S, tRNA-val, 16S) y para el gen nuclear (RAG1), utilizando las estrategias de partición descritas arriba.

Se seleccionó la mejor estrategia de partición mediante el Programa TRACER v1.5. (Rambaut y Drummond, 2007) utilizando como criterio el Factor de Bayes. Los factores de Bayes se estimaron a partir de 1000 replicas bootstrap con un límite de 10 a favor de la mejor estrategia de partición (Brandley *et al.*, 2005).

Se seleccionó el modelo de substitución para cada partición y para la matriz sin particiones con en el programa JModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012), bajo el criterio de información Akaike (AIC, Akaike, 1974).

Se corrieron dos búsquedas Bayesianas independientes mediante el algoritmo de Cadena Markov Monte Carlo (MCMC) con cuatro cadenas por búsqueda (1 fría y 3 calientes) por 30'000.000 de generaciones. La temperatura se fijó en 0.007 para todos los análisis con excepción de la búsqueda con el gen nuclear RAG1 en la cual se utilizó una temperatura de 0.01.

Para verificar la convergencia de las dos búsquedas independientes se utilizó el programa Tracer 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007), en el cual visualizó el grafico de LnL con el numero de generaciones para ambas cadenas combinadas. Se evaluó si la tendencia de las cadenas independientes fue similar y sin una tendencia a crecer o decrecer. A su vez descartaron las primeras búsquedas (burn-in) en las cuales aún no se había llegado a una asíntota. También se tomó como referencia el tamaño efectivo de la muestra (ESS) de las dos búsquedas combinadas con un valor mínimo de 200 en cada estadístico para ser considerados como convergentes. Por último se observó si al resumir la corrida del programa MrBayes (sump), los valores del factor potencial de reducción de escala (PSRF) fueron cercanos a 1, lo que indica un buen muestreo de las probabilidades posteriores y convergencia de las cadenas. Por último, los árboles filogenéticos fueron visualizados y editados en los programa FigTree v. 1.4.0 (Rambaut, 2012) y Dendroscope v3.2.4 (Huson y Scornavacca 2012).

4.2.5 ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

El árbol de máxima verosimilitud fue estimado con el programa GARLI v.2.0 (Zwickle, 2006) con 9 particiones de datos y los modelos evolutivos de la Tabla 4. La

estrategia de partición fue escogida en base a el criterio del factor de Bayes realizado para el análisis de IB.

Debido al alto número de terminales (267) se realizaron modificaciones de calibración recomendadas en el programa para 200 o más secuencias, y así tener un mejor rendimiento en el tiempo de búsqueda: se fijó el árbol de inicio por proceso aleatorio de adición paso a paso; el numero de archivos adjuntos por taxón proveniente de la búsqueda paso a paso se calibró en 5; el numero de generaciones fue de 5 000; el numero de veces que se reduce la precisión de optimización de las longitudes de rama al lo largo de la corrida se calibró en 1 y por ultimo el umbral de rechazo del árbol fue de 20. Se realizaron 20 réplicas de la búsqueda para asegurar que el paisaje de la verosimilitud había sido muestreado apropiadamente. Se realizó 100 replicas de bootstrap no paramétrico para obtener valores de soporte para cada nodo. El árbol consenso de las replicas fue obtenido en el programa Mesquite 2.7.5 (Maddison y Maddison, 2011).

4.2.6 ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA

Se obtuvo un cronograma en base a inferencia Bayesiana en el programa BEAST v.1.7.5 (Drummond *et al.*, 2013). El análisis incluyó solo los 57 terminales que tenían la totalidad de las secuencias. Las secuencias se dividieron en seis particiones: (1) gen 12S, (2) gen tRNA-Val, (3) gen 16S, (4) primera posición de los codones del gen Rag1, (5) segunda posición de los codones del gen Rag1, y (6) tercera posición de los codones del gen Rag1.

Se seleccionó el modelo de evolución para cada partición con el programa JmodelTest v2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012). Para ahorrar tiempo en la búsqueda, se utilizó como árbol inicial para la búsqueda la topología obtenida a partir de un análisis de Inferencia Bayesiana con el

programa MrBayes v.3.2.1. Se escogió el modelo de especiación de Yule el cual es apropiado para análisis de relaciones inter-especies.

Para calibrar el cronograma se tomó como referencia el nodo de raíz del árbol, el cual separa a los hílidos (*Agalychnis callidryas* y *Litoria caerulea*) de los miembros de la familia Craugastoridae utilizados en el análisis. Se tomó como referencia cinco tiempos en base a la literatura: 92,31 millones de años (Wiens, 2007), 80 millones de años (Wiens *et al.*, 2011), 50 millones de años (Roelants *et al.*, 2007) y 57 millones de años (Heinike *et al.*, 2007). En todos los casos se utilizó el modelo de reloj relajado lognormal no correlacionado y la tasa media en el reloj molecular relajado (ucld.mean) fue el inicial de 1-0E-4, forma 0.001, escala 1000 y en desplazamiento (Offset) de 1.0E-6 sugerido por los creadores del programa.

Para preparar el archivo en formato BEAST XML se utilizó el programa BEAUti v.1.5.7. Se corrió el análisis con 50'000.000 de generaciones; la convergencia la búsqueda fue verificada en el programa Tracer 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007) y se terminó un (burn-in) del 10%, el cual fue utilizado para obtener el árbol consenso en el programa TreeAnnotator v1.7.5 (Rambaut, 2012).

4.3 CANTOS DE ANUNCIO

Se analizaron cantos los cantos anuncio de poblaciones de *Pristimantis conspicillatus* obtenidas de la fonoteca del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (división herpetología), grabaciones de Morley Read y grabaciones hechas por nosotros en el campo como parte de este estudio.

Los espectrogramas y oscilogramas se realizaron y editaron utilizando el programa

Raven Pro, versión 1.2.1 (Bioacoustics Research Program, 2008). El espectrograma fue generado mediante una transformación Fourier directa (DFT) a partir de una muestra de 4096 puntos y una resolución de frecuencia de 10.8 Hz.

Se analizaron las siguientes variables: tasa de repetición de llamada; número de pulsos por llamada; duración (ms); frecuencia de pulsos dentro de una llamada; frecuencia dominante, frecuencia fundamental (Hz); tiempo de subida (Tabla 5). Se realizó un análisis de componentes principales para reducir la dimensión (numero de variables), obteniendo nuevos componentes o factores (que serán una combinación lineal de las variables originales). Para esto se utilizó el programa JMP v.9.0.1 (SAS Institute 2010).

4.4 ESPECIES CANDIDATAS E IDENTIDAD TAXONÓMICA DE *P. conspicillatus*

Para clasificar los linajes se tomó en cuenta el concepto de especie de de Queiroz (2005 a-c) que considera a las especies como linajes de metapoblaciones que pueden ser identificados por las propiedades biológicas contingentes que aparecen durante la evolución de dichos linajes (e.g. caracteres morfológicos, aislamiento reproductivo, monofilia recíproca, etc.). La taxonomía integrativa propuesta por Dayrat (2005) y Will *et al.* (2005) considera el uso de múltiples líneas de evidencia para establecer los límites de las especies.

Por lo tanto, en este trabajo se consideró que la congruencia de caracteres genéticos con caracteres acústicos era indicativa de la presencia de especies independientes. Las especies candidatas fueron asignadas a dos categorías: (1) Especies candidatas no confirmadas (ECNC) para grupos de individuos que muestran considerables distancias genéticas pero para los cuales no se contó con información de otros caracteres y por lo tanto

no se pudo confirmar su estatus de especie, (2) especies candidatas confirmadas (ECC) para grupos de individuos con considerables distancias genéticas que fueron congruentes con diferenciación morfológica o acústica (Vietes *et al.* 2009).

A pesar de las revisiones realizadas para definir la identidad taxonómica de *Pristimantis conspicillatus* (e.g. Cochran y Goin, 1970; Lynch, 1976); la ambigüedad de la localidad tipo como “Andes de Ecuador” (Günther, 1858), que el holotipo ya se encontraba en mal estado en el momento de su descripción sumado a la dificultad de identificación de las ranas de este grupo (Padial y De la Riva, 2009). Es necesario revisar la identidad taxonómica de la especie en función a los nuevos datos filogenéticos del presente trabajo, basándonos en comparación morfológica (fotografías del holotipo) y a la expedición en la cual fue colectado.

4.5 DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y PRIORIDADES DE CONSERVACIÓN

Para estimar las prioridades de conservación en función de medidas filogenéticas se utilizó un Árbol de Inferencia Bayesiana con genes mitocondriales (12S, 16S, COI) y el gen nuclear Rag1 con 9 particiones (Sección 4.2.1 del presente trabajo) con un total de 62 terminales, una por cada especie o especie candidata de los grupos de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*. El análisis se realizó con el modulo Tuatara v.1.01 (Maddison y Mooers, 2009) diseñado para el programa Mesquite (Maddison y Maddison, 2011). Las medidas que se tomaron fueron: (1) la distinción evolutiva (ED), que mide el largo de la rama terminal de la especie más su parte ponderada de la rama ancestral de la especie (Isaac *et al.*, 2007) y (2) la distinción evolutiva de los clados (EDc), que mide la longitud de la rama terminal de la especie más su parte ponderada del clado de la rama ancestral (Redding y Mooers, 2006).

El programa Tuatara permite incluir el estado de conservación de las especies (e.g. listas rojas de especies amenazadas) sin embargo debido a la cantidad de especies candidatas y datos faltantes se omitió esta calibración, ya que varias terminales no contarían con una categoría o estarían erróneas por haber sido evaluadas como una sola especie cuando son posibles complejos de varias especies.

4.6 FICHAS INFORMATIVAS

Una herramienta importante para conservar especies es hacer pública y de fácil acceso información acerca de éstas. Es por esto que se realizaron Sinopsis Informativas de las especies del grupo *Pristimantis conspicillatus* presentes en Ecuador, las cuales forman parte del portal electrónico AmphibiaWebEcuador del Museo de Zoología QCAZ (<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/Anfibios/AnfibiosEcuador/Default.aspx>) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

La matriz completa tuvo ~4103 pb; ~681pb del gen mitocondrial COI, ~996 pb del gen 12S, ~80 pb del gen tRNA-val, ~1692 pb del gen 16S y ~ 650 del gen nuclear RAG1 obtenida para 267 individuos (Tabla 2) de los cuales 41 pertenecen al grupo externo y 226 al grupo interno. El modelo de evolución para la matriz sin particiones fue el GTR + I + G.

En varios casos no se obtuvieron secuencias completas para todos los genes (Tabla 2)

debido a que no se encontraban disponibles en el Genbank o no se consiguieron amplificar en el laboratorio, sin embargo fueron incluidos en el análisis ya que estos datos faltantes no presentan influencia negativa en este tipo de estudios filogenéticos (Wiens y Morrill, 2011; Wiens y Tiu J, 2012).

5.1.1 ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA Y MÁXIMA VEROSIMILITUD

La mejor estrategia de partición obtenida mediante factor de Bayes fue la de 9 particiones por lo que se utilizó para el análisis de IB y MV. Tanto los análisis de IB como los de MV se muestran representados en el mismo árbol (Fig. 2) con los respectivos soportes para cada análisis.

La filogenia muestra al grupo de especies *Pristimantis conspicillatus sensu* Hedges *et al.*, (2008) como monofilético con un bajo soporte tanto el IB como en MV, este grupo es hermano del clado que forman *P. caprifer*, *P. affinis*, *P. nevicus*, *P. euphronides*, *P. shrevei* y *P. savagei* que en adelante lo denominaremos Grupo *P. affinis*. El grupo de especies *P. peruvianus* es monofilético con un alto soporte. Los tres grupos (*P. peruvianus*, *P. conspicillatus* y *P. affinis*) forman un clado con un bajo soporte en el análisis de IB y MV.

Tanto el árbol obtenido con la estrategia de 9 particiones como el de una partición tuvieron una topología similar. En el caso del árbol de genes mitocondriales (Fig. 3) y el del gen nuclear (Fig. 4) muestran una menor resolución, en especial en el del gen Rag1 se observan bastantes politomías.

A continuación se presentan los resultados dentro de cada grupo de especies. Las

distancias genéticas referidas son p no corregidas para el gen 16S, el cual ha sido utilizado ampliamente en anuros tropicales, incluido el género *Pristimantis* (Fouquet *et al.*, 2007; Padial *et al.*, 2007; Padial *et al.* 2009; Hedges *et al.*, 2008).

GRUPO DE ESPECIES *Pristimantis peruvianus*

Dentro del grupo de especies *Pristimantis peruvianus* (Fig. 2), la especie *P. rhabdolaemus* está separada en tres clados, el primero y más basal lo consideramos como Especie Candidata No Confirmada (ECNC) 1 con distribución restringida a Bolivia (Fig. 5) y dos clados peruanos de los cuales en uno contiene un espécimen cercano a la localidad tipo (CORBIDI 6949) por lo que mantenemos el nombre *P. rhabdolaemus* en ese clado y asignamos como ECNC2 al otro clado; la ECNC 2 y *P. rhabdolaemus* están separados por una distancia genética no corregida p de 0.09 (gen 16S).

Pristimantis toftae se divide en dos clados, uno que incluye un espécimen cercano a la localidad tipo (*P. cf. toftae* KST0208) de Huanuco Puerto Inca y ECNC3. Estos clados están separados por una distancia genética de 0.08.

Pristimantis danae se encuentra en dos clados: *P. danae sensu stricto* por contener especímenes cercanos a la localidad tipo (Fig. 5) Kosñipata, en Perú (Fig. 2) y una ECNC 4 del nor-occidente boliviano (ambos grupos separados por una distancia genética 0.07); del mismo modo, *P. reichlei* se encuentra en dos clados: *P. reichlei sensu stricto* al cual pertenece el paratopotipo (MNK-A 6621) y ECNC 5 (Fig. 6e); ambos grupos separados por una distancia genética de 0.13.

Cada una de las otras especies del grupo *P. peruvianus*: *P. stictogaster* (holotipo), *P. Albertus* (holotipo) y *P. aniptopalmaris* (holotipo) forman grupos monofiléticos con alto soporte.

GRUPO DE ESPECIES *Pristimantis conspicillatus* y *Pristimantis affinis*

Las especies *Pristimantis affinis*, *P. caprifer*, *P. euphronides*, *P. nervicus*, *P. savagei*, *P. shrevei* y ECNC 6 (Fig. 2) forman un clado con alto soporte en el análisis IB pero no así en el MV. Este clado es hermano del clado de *Pristimantis* del grupo *P. conspicillatus*; cabe recalcar que a excepción de *P. caprifer* y *P. savagei*, las demás especies de este clado pertenecen al grupo *P. unistrigatus* y este clado se encuentra en el norte de Sudamérica (Fig. 7) y en el caso *P. euphronides* y *P. shrevei* en las Antillas menores.

Este clado difiere en el árbol con los genes mitocondriales y el nuclear del árbol obtenido con solo genes mitocondriales (Fig. 3), y del gen nuclear por separado (Fig. 4) ya que con un bajo soporte y como parte de una politomía el grupo *P. affinis* no se encuentra como hermano del grupo *P. conspicillatus* sino entre taxones del grupo externo.

El grupo *P. conspicillatus* contiene 37 especies, por lo que a partir de aquí este se utilizarán letras para subdividir los cinco clados.

CLADO A

Dentro del clado del grupo *P. conspicillatus* hay dos clados basales. El primero contiene 8 especies: *P. gagei*, *P. vinhai*, *P. paulodutra*, *P. ramagi*, ECNC 8 que es hermana de *P. vinhai* separados por una distancia genética de 0.07 y dos especies candidatas no confirmadas (ECNC 6 y ECNC 7) una de ellas hermana de *P. terraeboliviaris* (Fig. 2). Este clado se distribuye en el bosque Atlántico brasileiro excepto por *P. gagei* que está en Centroamérica y Colombia (Fig. 8).

CLADO B

Este clado que contiene a *P. chiastonotus* y *P. samaipatae* (Fig. 6f) está compuesto de siete especies (Fig. 2) de las cuales tres son candidatas no confirmadas; la ECNC9 de Bolivia (Fig. 9) y ECNC10 de Brasil que a su vez son las más basales del grupo. *Pristimantis koehleri* y *P. fenestratus* son especies hermanas con una distancia genética de 0.03 entre ellas y la ECNC 11 con respecto a *P. koehleri* una distancia genética de 0.08.

CLADO C

Este clado contiene a *P. avicuporum* y *P. bipunctatus*. Está compuesto de siete especies de las cuales dos son candidatas no confirmadas: la ECNC12 que es hermana de *P. avicuporum* y la ECNC13 que es hermana de *P. adistolus* y *P. bipunctatus* (holotipo). Dentro de este clado también se encuentran individuos determinados como *P. peruvianus*, los cuales forman un clado con alto soporte. Los especímenes CORBIDI 6653 y CORBIDI 6788 fueron colectados cerca de la localidad tipo en San Martín-Perú, por lo que asignamos, aunque con ciertas reservas, a estas como *P. peruvianus sensu stricto* (Fig. 10).

CLADO D

Este clado contiene a *Pristimantis achatinus* y *P. lymani*; está compuesto de siete especies de las cuales cinco son candidatas no confirmadas. La especie denominada *P. achatinus* de Panamá (Fig. 11) la consideramos como ECNC 14 y es hermana de la ECNC 15, entre estas hay una distancia genética de 0.03 y forman un clado separado del resto de integrantes del clado D con alto soporte tanto en el análisis de IB como MV; el clado hermano con un bajo soporte contiene a la ECNC 16, *P. achatinus* (cercana a la localidad tipo en Manabí), a la ECNC 17 y a *P. lymani* hermana de la ECNC18 con una distancia genética entre ambos de 0.04.

CLADO E

Este clado está compuesto de 11 especies: *Pristimantis condor*, *P. conspicillatus*, *P. citriogaster* y *P. malkini* (Fig. 6d), cuatro Especies Candidatas Confirmadas (ECC) y tres candidatas no confirmadas (Fig. 2).

Pristimantis condor es el más basal del clado, en este trabajo se incorpora una secuencia (QCAZ 40793) de la localidad tipo (Río Piuntza). *Pristimantis malkini* y *P. citriogaster* se muestran como hermanas con un alto soporte tanto en el análisis de IB y MV; entre estos clados del sur oriente ecuatoriano se encuentra *Pristimantis conspicillatus sensu stricto* (QCAZ 48642, QCAZ 17013, QCAZ 46413) por las razones que se presentan en la Discusión como hermano de la ECC 4. La distribución es Amazonía y estribaciones andinas del este de Ecuador y el norte de Perú (Fig. 12)

Las cuatro especies ECC1 (Fig. 6b), ECC2, ECC3 y ECC4 presentan un alto soporte en los análisis filogenéticos y el análisis de cantos de anuncio (ver sección 5.2); esta congruencia de caracteres genéticos con los acústicos son los dos tipos de evidencia de especies independientes por las cuales las asignamos como Especies Candidatas Confirmadas.

5.1.2 ESTIMACIÓN DE LOS TIEMPOS DE DIVERGENCIA EVOLUTIVA

Los estimados para los tiempos de divergencia de nodos representativos en función a los diferentes tiempos de calibración se muestran en la Tabla 6. Estos estimados muestran una alta variación en función a la calibración, para el grupo de especies *P. conspicillatus*, puede existir una diferencia de hasta 25 Ma entre la calibración de Roelants *et al.* (2007) y la propuesta por Wiens (2007). A continuación discutiremos los estimados basados en la

calibración de Heinike *et al.*, 2007 debido a que ha sido el más utilizado en *Pristimantis* y grupos cercanos (e.g. Pinto *et al.*, 2012).

El cronograma (Fig. 13) muestra 59 especies de las cuales 28 son del grupo de interés y 31 como grupos externos muestran que el primer evento de divergencia entre el grupo de especies *P. peruvianus* y el Grupo *P. conspicillatus* fue hace aproximadamente 30.19 Ma. Dentro del grupo *P. conspicillatus* el evento de divergencia más antiguo es la separación de *P. euphronides* del resto del grupo (27.04 Ma) y *P. paulodutrai* representante del grupo A, se separa hace 23.38 Ma. Durante el Plioceno se separa *P. stictogaster*, *P. aniptopalmatus*, *P. lymani*, *P. conspicillatus*, *P. bipunctatus*, *P. peruvianus*, *P. samaipatae*, ECNC, ECC 3, ECNC18, 20, 21, ECNC 22 y las especies más recientes durante el Pleistoceno *P. koehleri*, *P. fenestratus* y la ECNC11.

5.2 CANTOS DE ANUNCIO

En el análisis de componentes principales del Grupo de especies *P. conspicillatus*, el primer componente (CP1) explica el 41,22% de la variación (autovalor = 2,89); el segundo componente explica el 22,8% de la variación (autovalor = 1,59). En el CP1 la duración de la llamada, tiempo de subida y el número de pulsos por nota tienen las cargas más altas mientras que en el CP2 son la frecuencia fundamental y la dominante.

La proyección del CP1 y CP2 (Fig. 14) muestran una clara agrupación para el clado de Tungurahua (Río Verde) al cual denominamos ECC1 en la filogenia (Fig. 2); también se observa una separación entre dos clados del nor-oriental ecuatoriano (Parque Nacional Yasuni) ECC 3 y ECC4. El canto de *P. conspicillatus* se asemeja al del ECC3, sin embargo solo se cuenta con una grabación. Existe un último canto grabado en la localidad de San José de

Morona (Morona Santiago) pero el individuo no fue colectado por lo que en el análisis se dejó como *P. cf. conspicillatus*.

Los análisis filogenéticos (Fig. 2) muestran una concordancia con los análisis de cantos (Fig. 14) para las cuatro especies candidatas confirmadas, sin embargo tanto para el clado de *P. conspicillatus* como para la ECC2 solo se contó con una grabación por clado por lo que no se puede observar una variación de los cantos de la misma especie. El canto correspondiente a *P. cf. conspicillatus* en el análisis, no cuenta con un individuo colectado por lo que no podemos afirmar si es una especie diferente o si pertenece a algún clado del análisis filogenético ya que al haber sido colectado en la misma localidad de *P. conspicillatus* podría ser una variación de la misma especie.

5.3 DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y PRIORIDADES DE CONSERVACIÓN

Los valores obtenidos en base al ED (Tabla 7) muestran que las especies con mayor distinción evolutiva son la no descrita ECNC 6 (ED=0.85) del noreste de Brasil (Pacoti) y *Pristimantis caprifer* (ED=0.75) que es la segunda especie con alta prioridad de conservación seguida de *P. terraebolivaris*, *P. reichlei*, *P. ramagi*, *P. avicuporum*, *P. lymani*, ECNC5, ECNC7, ECNC 8, ECNC 9, ECNC 10, que presenta un ED entre 0.75 y 0.5. Las demás especies muestran un valor menor a 0.5. El árbol resultante de este análisis (Fig. 15) muestra las prioridades para todos los taxa.

En el caso del EDc las especies con mayor distinción (Tabla 7) son la ECNC 6 (EDc=0.87) al igual que en el ED y *P. caprifer* (EDc= 0.77) es la segunda especie con valores más altos seguido de *P. terraebolivaris*, *P. avicuporum*, *P. reichlei*, *P. ramagi*, *P.*

chiastonotus, *P. skydmainos*, *P. gaigei*, *P. lymani*, ECNC 5, ECNC 7, ECNC 8, ECNC 9 y ECNC 10 (Fig. 16).

5.4 SINOPSIS INFORMATIVAS

Una revisión de cada una de las ocho especies presentes en Ecuador (*P. achatinus*, *P. condor*, *P. conspicillatus*, *P. malkini*, *P. lymani*, *P. peruvianus*, *P. skydmainos* y *P. metabates*), con información acerca de la distribución, identificación, descripción, hábitat, biología, estatus de conservación, y taxonomía fueron realizados en el portal de AmphibiaWebEcuador (Ron *et al.*, 2013) del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. En el portal también están disponibles fotos, grabaciones de canto, video y mapas de distribución. La dirección para acceder a las sinopsis es <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/>.

6. DISCUSIÓN

6.1 FILOGENÉTICA Y SISTEMÁTICA

El análisis filogenético presentado por Pinto-Sánchez *et al.*, 2012 no recupera como monofilético los subgéneros de *Pristimantis*: *Hypodictyon*, *Yunganastes* y *Pristimantis* de Hedges *et al.* (2008) debido a que una sola especie, *Pristimantis pluvicanorus* (AMNH-A 165195) publicada por Faivovich *et al.* (2005), representante del subgenero *Yunganastes* (Padial *et al.*, 2007, Hedges *et al.*, 2008) se encuentra dentro del subgénero *Pristimantis* en el grupo de especies *P. peruvianus* (contra Padial *et al.*, 2009). En trabajos como Hedges *et al.* (2008); Pyron y Wiens (2012) y en el presente estudio, esta secuencia se encuentre dentro del

grupo *P. peruvianus* pero Padial *et al.* (2007) aclara que la secuencia determinada como *P. pluvicanorus* de Faivovich *et al.* (2005) utilizadas en estos estudios es en realidad *P. rhabdolaemus*. Por lo que la monofilia de los subgéneros *Pristimantis* y *Yunganastes* además de la monofilia del grupo de especies *P. peruvianus* es consistente.

Hedges *et al.* (2008) muestran al grupo *P. conspicillatus* como hermano del grupo *P. peruvianus* en la mayoría de sus análisis; la relación filogenética entre los grupos de especies *P. peruvianus*, *P. conspicillatus* y *P. affinis* obtenida en este trabajo solo es congruente con el árbol de Inferencia Bayesiana de Hedges *et al.*, (2008) para 1848 pb donde el grupo *P. conspicillatus* es hermano del grupo *P. affinis*. Otros trabajos (Pyron y Wiens., 2011; Pinto-Sánchez *et al.*, 2012; Canedo y Haddad, 2012) presentan una topología en la que el clado *P. affinis* es hermano de un clado formado por los grupos *P. peruvianus* y *P. conspicillatus*. El soporte para estas relaciones es bajo, tanto en el presente trabajo como en los previos. Por lo tanto, la relación aun es incierta y tal como menciona Hedges *et al.*, 2008, no se puede considerar como serie o un subgénero distinto hasta no tener clara la posición filogenética de estos dos grupos.

Al encontrarse *P. caprifer* en el grupo *P. affinis* el tamaño del dedo de la mano (primer dedo más largo que el segundo) se consideraría una sinapomorfía del grupo de especies *P. conspicillatus*, pero no así el vientre liso ya que *P. skydmainos* presenta el vientre areolado.

Dentro del grupo de especies *P. peruvianus*, entre las muestras de *P. reichlei* hay una secuencia identificada incorrectamente como “*Pristimantis peruvianus*” (MHNSM 9267) y que fue usada por Hedges *et al.*, (2008) para dar el nombre al grupo de especies *Pristimantis peruvianus*. Por lo tanto, el nombre del grupo de especies *P. peruvianus sensu* Hedges *et al.*, (2008) queda obsoleto y se propone un nuevo nombre para el clado como Grupo de especies *Pristimantis rhabdolaemus* que es la especie más antigua del grupo.

Dentro del clado *P. rhabdolaemus*, la especie *P. danae* es parafilética y contiene dos clados: *P. danae sensu stricto* perteneciente a la localidad tipo (Valle de Kosñipata, Perú) con un alto soporte y un clado de Bolivia, la SCNC 2. En el análisis realizado por Padial y de la Riva (2009a) las relaciones filogenéticas entre estos clados y *P. reichlei* presentaban un bajo soporte y dos topologías alternativas. Los resultados son consistentes con la topología encontrada por Padial y de la Riva (2009a) en su análisis de Inferencia Bayesiana. En nuestra filogenia hay un alto soporte que descarta que *P. danae sensu lato* forme un grupo monofilético.

En Padial *et al.* (2009b) se incluyen secuencias de *P. reichlei* para determinar el estado taxonómico de esta y otras especies del genero *Pristimantis*. La revisión se basó en el concepto de la “taxonomía integrativa” usando las diferentes líneas de evidencia para su clasificación. En ese trabajo se define a *Pristimantis reichlei* como una especie “estable”. Sin embargo, el aumento de secuencias (dos en el presente estudio y una de Pinto-Sánchez *et al.*, 2012) sumada a las de los trabajos de Padial *et al.* (2009 a, b) muestran una separación en dos clados con un alto soporte, lo que sugiere la existencia de una especie no descrita dentro de “*P. reichlei*” de Padial *et al.* (2009b).

Dentro del grupo de especies *P. conspicillatus* existen 26 especies candidatas. Tan solo en el clado de las especies bajo el nombre *P. conspicillatus* (Clado D de la Fig. 2) existen cuatro Especies Candidatas Confirmadas, las cuales se identificaron por su variación genética y de canto de anuncio y tres no confirmadas; la diversidad críptica en este grupo es bastante alta y para resolver sus problemas taxonómicos es importante determinar a cuál de las especies identificadas correspondería el binomial *Pristimantis conspicillatus*.

IDENTIDAD TAXONÓMICA DE *Pristimantis conspicillatus*

Günther (1858) en el primer catalogo: *Batrachia Salienta in the Collection of the British Museum*, describe *Pristimantis conspicillatus* basado en un solo espécimen (BMNH 1947.2.16.20) (Fig. 17) una hembra en mal estado de preservación colectada por Louis Fraser en la localidad “Anden von Ecuador”. La descripción es poco detallada (Anexo 3) y no incluye ilustraciones.

En 1882 G. A. Boulenger publica la segunda edición del catálogo: *Batrachia Salienta in the Collection of the British Museum*, donde hay una descripción más detallada de *P. conspicillatus* incluyendo individuos del Oeste de Ecuador, Sarayacu e Intag, y proporciona una ilustración. Parte de la descripción y el dibujo son erróneos ya que algunos especímenes y la ilustración corresponden a *Pristimantis w-nigrum*. El error es consecuencia de la identificación y etiquetado incorrectos de los frascos por el curador del departamento de Zoología del British Museum, Albert Günther. Estos errores fueron notados por Lynch (1975).

Lynch (1975) en base a la revisión del holotipo discute la identidad taxonómica de *P. conspicillatus* y presenta una redescrición en base a material colectado en la Amazonía norte de Ecuador (Provincia de Napo y algunos individuos de Pastaza), Colombia (provincia de Putumayo) y Perú (Departamento de Loreto, Pasco y San Martín). Asigna a *P. conspicillatus* individuos con distribución entre 300 y 1000 msnm de la Amazonía de Ecuador, Perú y Colombia. Sin embargo, la redescrición de la especie en base a especímenes de nor-oriente de Ecuador es incorrecta puesto que por su distribución geográfica es improbable que pertenezcan a *P. conspicillatus* (ver abajo).

Existen varios clados de nuestra filogenia con morfología similar a la del holotipo y que por lo tanto podrían considerarse *P. conspicillatus*. La asignación del nombre *P. conspicillatus* también se ve dificultada por la ambigüedad de la localidad tipo “Andes de Ecuador”. Sin embargo, la identidad de la especie puede esclarecerse en base a información adicional sobre las localidades de colecta de Fraser. En base a información de los detalles de su expedición provistas en la literatura (Fraser 1858a, b; Fraser 1859a-d; Fraser 1860; Sclater, 1859a-c; Sclater 1860a-e; Sclater 1869; Tomes 1859, Tomes, 1860) (ver detalles en Anexo 4) se puede concluir que la localidad de colección del holotipo es Zamora (Provincia de Zamora) o Gualaquiza (Provincia Morona Santiago). Las únicas especies que se sobreponen con ambas localidades (Fig. 18) son la ECC2, la ECNC 20, *P. condor* y el clado que asignamos como *P. conspicillatus* (Figs. 2 y 18).

La morfología del holotipo y la descripción original permiten determinar cuál de los cuatro clados corresponde a *P. conspicillatus*. Al momento de la descripción, hace 155 años, el holotipo se consideraba en mal estado (Günther, 1958). En la actualidad, la decoloración que ha sufrido es bastante marcada y podría explicar que Lynch (1975) reporte que el holotipo tiene un vientre inmaculado. Sin embargo, la descripción original, a pesar de no ser muy detallada, hace referencia al vientre marmolado con marrón oscuro (Günther, 1958). La referencia de una barra interorbital negrusca que actualmente es casi imperceptible en el holotipo (Fig. 13) y la descripción de las piernas de color negro que son ahora de color marrón confirman el estado de decoloración del holotipo. La presencia de manchas en la garganta del holotipo (Fig. 13) y la descripción del vientre como marmolado oscuro hace que asignemos al clado de *P. conspicillatus* (QCAZ 46381, QCAZ 46413, QCAZ 17013, QCAZ 48642, CORBIDI 7475 Y CORBIDI 7484) (Fig. 19) como *sensu stricto*. Los otros clados fueron descartados principalmente por el patrón de coloración en el vientre (ECC 2, ECNC

20), *P. condor* tiene el vientre fuertemente pigmentado pero el patrón de coloración de las piernas casi no presenta reticulaciones por lo que a pesar de tener una colecta en Gualaquiza (Fig. 18) y el vientre pigmentado, fue descartado como posible candidato.

IDENTIDAD TAXONÓMICA DE *Pristimantis peruvianus*

Pristimantis peruvianus fue descrito por Melin (1941), la localidad tipo es Roque, Departamento de San Martín en Perú. Lynch (1975) al mismo tiempo que redescubre a *P. conspicillatus* revisa el holotipo de *P. peruvianus* y lo asigna como sinónimo de *P. conspicillatus*. Lynch y Duellman (1980) remueven esta sinonimia y asigna a *P. peruvianus* como una especie de estribaciones pudiendo llegar a casi los 2000 de altitud y lo diferencia de *P. conspicillatus* por presentar la garganta con fuertes marcas marrones, ser de tamaño ligeramente más grande, presentar líneas cantales, supratimpánicas y por mostrar la piel del dorso granular.

Pristimantis peruvianus formaba parte del grupo de especies *P. conspicillatus*; sin embargo Hedges *et al.*, (2008) crea el grupo de especies del mismo nombre pero advierte la necesidad de la secuencia de un topotipo (ya que la secuencia utilizada en ese trabajo no lo era) para resolver si este grupo retiene el nombre o toma uno nuevo. A pesar de no haber examinado el material tipo o los especímenes del Perú, se propone que las series CORBIDI 6394; CORBIDI 6652 y CORBIDI 6788 identificadas como *P. peruvianus* y por la cercanía a la localidad tipo (San Martín-Perú) los asignamos como *Pristimantis peruvianus sensu stricto* y los clasificamos dentro del grupo de especies *P. conspicillatus* aunque es necesario confirmar si existe congruencia morfológica entre el holotipo y los individuos asignados.

En base a las muestras secuenciadas en este estudio, *P. peruvianus* no está presente en Ecuador y la distribución del grupo de especies (ahora *Pristimantis rhabdolaemus*) está restringida a Perú, Bolivia y Brasil.

6.2 TIEMPOS DE DIVERGENCIA EVOLUTIVA

Los grupos *P. rhabdolaemus*, *P. conspicillatus* y *P. affinis* se separan entre si durante el Oligoceno temprano hace ~30 Ma, lo cual corresponde a un periodo de cambios ambientales, especialmente el enfriamiento abrupto del clima (Prothero, 1994), pero la mayor diversificación dentro de los *Pristimantis* del grupo *P. conspicillatus* y *P. rhabdolaemus* fue durante el Mioceno–Plioceno.

Durante el Mioceno medio ocurre un levantamiento de los Andes (11-14 Ma) donde la cordillera alcanza una altitud de 1000 m de altitud (Potts y Behrensmeyer, 1992; Gregory-Wodzicki, 2000). El Clado D se encuentra al oeste de la cordillera, representado en el análisis de divergencia evolutiva por las ECNC 16, 18 y *P. lymani* y el clado E. *Pristimantis lymani* es la única especie del clado D que se encuentra en ambos lados de la cordillera al sur por lo que este levantamiento de los Andes no pudo ser una barrera para estas especies a pesar de coincidir con este levantamiento de los Andes durante el Pleistoceno.

Pristimantis achatinus se encuentra en Centroamérica y en la región Chocó de Sudamérica. La ECNC 14 fue reportada como *P. achatinus* de Panamá por Pinto-Sanchez *et al.* (2012). Según ese trabajo, la presencia de *P. achatinus* en Panamá es producto de una invasión ocurrida durante la formación del istmo de Panamá sin subsecuente especiación. Sin embargo si se confirma la ECNC 14, existiría especiación relativamente sincrónica con la formación del istmo de Panamá ya que *P. achatinus* se encuentra en la región Chocó y la

ECNC 14 en Centroamérica.

Especies del grupo *P. affinis* como *P. euphronides* de la isla Granada y *P. shrevei* de la isla San Vicente y las Granadinas, son las únicas de este estudio endémicas al caribe (ambas en las Antillas Menores). Heinike *et al.*, 2007 a pesar de no incluir a estas especies en sus análisis proponen que pueden ser producto de dispersión desde el continente durante el Plioceno. El trabajo de Pinto-Sánchez *et al.* (2012) muestra una divergencia entre *P. affinis* y *P. euphronides* de ~4 Ma durante el Plioceno lo que corrobora la hipótesis de Heinike *et al.*, (2007). Una especie del grupo *P. conspicillatus*, *P. terraeboliviaris* se encuentra tanto en Venezuela como en Trinidad y Tobago la cual es una isla que forma parte de las Antillas Menores y es la más cercana al continente (12 km de Venezuela).

Especies como *P. paulodutraii*, *P. vinhai* y *P. ramagi* habitan en el Bosque Atlántico brasileiro. Su rango geográfico puede deberse a varias razones; recientes estudios muestran que especies de la mata atlántica brasileira como *Adelophryne* pueden haberse originado de especies amazónicas y ocurrir tanto en bosque Amazónico como Atlántico (Fouquet *et al.*, 2012b). Esto podría deberse a que durante el Cenozoico existieron grandes cambios ambientales como el aumento de la aridez del suelo y descenso de la temperatura (Flynn y Wyss, 1998). En el Eoceno medio hubo una propagación de la vegetación abierta a expensas del bosque tropical que antes dominaba el sur del continente lo que dió origen un corredor seco que aisló la Amazonía de la Mata Atlántica (Roig-Juñent *et al.*, 2006; Romero, 1986), lo cual explicaría la presencia que especies del grupo *P. conspicillatus* en la Mata Atlántica brasileira.

Los ríos pueden jugar un rol importante en la delimitación geográfica de la distribución de especies. Estudios realizados en diversificación de las ranas amazónicas como *Engystomops petersi* sugieren que los ríos pueden actuar como barreras al flujo génico en la Amazonía (Funk *et al.*, 2007). Otros estudios han encontrado poca soporte a la hipótesis de

ríos como barreras (Aleixo, 2004; Cheviron *et al.*, 2005; Hall y Harvey, 2002; Hayes y Sewlal, 2004; Höglund y Shorey, 2004). En este trabajo no se observó un patrón claro de divergencia genética entre poblaciones separadas por el río Napo. En *P. malkini* no hay mayor afinidad genética entre poblaciones al norte o al sur del río Napo. Sin embargo, el río Doce en el bosque Atlántico del Brasil separa a *Pristimantis ramagi* (norte del río) de *P. vinhai* y *P. paulodutrai* (sur). En patrón similar se ha sido reportado en la misma región en ranas del género *Dendrophryniscus* (Fouquet *et al.*, 2012a), *Adelophryne* (Fouquet *et al.*, 2012b) y lagartijas del género *Leposoma* (Pellegrino *et al.*, 2011). el Valle del Río Doce (Carnaval *et al.*, 2009; Costa, 2003; Pellegrino *et al.*, 2005; Pinto-da-Rocha *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2004; Fouquet *et al.*, 2012a) muestran separaciones entre ambos lados del valle.

Según Lynch y Duellman (1997) durante el Plioceno (~ 3 Ma) el descenso de la temperatura, disminución de la precipitación y del nivel del mar durante las fases glaciales y el aumento de la temperatura durante los interglaciales han influenciado en la distribución de *Pristimantis* de estribaciones y tierras bajas en Ecuador. La formación de refugios durante el Cuaternario fue propuesta por Haffer (1969, 1974) en donde los biomas cambiaron continuamente, tanto en su distribución, como en su fragmentación y coalescencia, dividido a las fluctuaciones climáticas. No tienen soporte en el presente estudio, a pesar de que existen divergencias durante este periodo como *P. koehleri*, *P. fenestratus*, ECNC 11, ECNC 21, ECNC 22 que podían coincidir con los refugios propuestos para ranas dendrobátidas (Noonan y Wray, 2006) Estas no coinciden con los refugios propuestos.

Padial y De la Riva (2009) proponen que las especies *P. danae* y *P. rechlei* tienen una reciente divergencia por aislamiento en refugios húmedos, los cuales consisten en una expansión desde zonas altas a tierras bajas (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013); sin embargo mi cronograma la separación de estas especies es mucho más antigua, hace mas de 11 Ma durante el Mioceno por lo que la divergencia no estaría relacionada con la aparición de

refugios en el Pleistoceno. Del mismo modo Padial y De la Riva (2009) proponen que en el caso de *P. koehleri* y *P. samaipatae*, la divergencia pudo ser consecuencia del proceso de especiación por refugios secos (Pennington *et al.*, 2000; Killeen *et al.*, 2007), en el cual las poblaciones quedan aisladas debido a cambios en el clima en donde se pierde diversidad genética y una vez reestablecidas las condiciones ambientales, prosigue un proceso de recolonización (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013). Estas especies divergieron en el Mioceno tardío, hace 9 Ma por lo que esta hipótesis no puede ser aceptada, pero si podría ser la razón por la cual la ECNC 11, *P. koehleri* y *P. fenestratus* divergieron hace ~2.5 Ma.

En los *Pristimantis* como en otros grupos de ranas amazónicas, al parecer no existe un claro patrón geográfico o una fuerza paleoambiental que haya surgido como explicación general de su diversificación (Antonelli *et al.*, 2010). Es necesario realizar estudios más profundos para delimitar hipótesis de especiación especialmente en un grupo como este en el que son evidentes varios procesos de especiación.

Existe una gran variación en los estimados de tiempo de divergencia evolutiva en función a la fuente de calibración. Esta diferencia es tan grande (hasta 25 Ma para el mismo nodo), que se pueden obtener resultados completamente diferentes dependiendo de la calibración empleada en los análisis. Se decidió utilizar en este caso la propuesta por Heinike *et al.* (2007) pero no se descarta que las otras cuatro propuestas sean incorrectas.

6.3 DIVERSIDAD FILOGENÉTICA Y PRIORIDADES DE CONSERVACIÓN

A partir del análisis de distinción evolutiva se puede estimar el impacto de la pérdida de una especie en la riqueza filogenética de un grupo (Faith, 2008), tomando como referencia el largo de las ramas del árbol. Las especies con un alto ED presentan una acumulación de

características distintivas las cuales tienen mayor prioridad para ser conservadas. En este estudio la especie no descrita ECNC 6 es la que presenta los valores más altos tanto para el ED como para el EDc. Esto muestra que una especie aun no descrita es la de mayor importancia entre las 63 incluidas en el análisis y revela la necesidad de estudios que busquen descubrir la diversidad críptica de las especies. El largo de la rama de ECNC 6 sugiere que posee características únicas por lo que su conservación tendría prioridad en términos evolutivos para el grupo.

La segunda especie con alta prioridad de conservación fue *P. caprifer*, la cual está categorizada como en Preocupación Menor por la UICN debido a su amplia distribución (en Ecuador y Colombia), su posible tolerancia a la modificación del hábitat y la presunción de que la población tiene un gran tamaño (Castro *et al.*, 2004). Según colecciones del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales y la base de datos del Museo de Zoología QCAZ, esta especie no ha sido registrada en Ecuador desde 1984 por lo que podría encontrarse entre las más amenazadas. Por su distinción evolutiva y estado de conservación puede ser considerada entre las especies del grupo *P. conspicillatus* con mayor prioridad para la conservación.

Los resultados también muestran que las especies con menor prioridad de conservación en términos evolutivos se encuentran en los clados que están compuestos por más especies candidatas como el clado que contiene a *P. conspicillatus sensu stricto*. Esto debido a que clados con más especies son las que perderían menos información evolutiva si alguna se extingue (Faith, 1992). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en este estudio existe un sesgo de muestreo que podría estar influenciando el análisis. Las secuencias son mayoritariamente de Ecuador, Perú y Bolivia, por lo que los valores bajos de ED y EDc para especies de estos países pueden deberse a que están mejor representados en el análisis. Tener un muestreo representativo de todos los taxa en todo su rango de distribución podría dar un resultado mas certero de distinción evolutiva.

En los análisis de distinción evolutiva es posible incluir como calibración categorías de riesgo de extinción como los de la Lista Roja de la UICN. La inclusión de estas categorías añadiría prioridades de conservación mas reales (Issac *et al.*, 2007), ya que además de la importancia evolutiva, reflejarían la urgencia de tomar decisiones y acciones para la conservación de las especies. Por ejemplo, *P. shrevei* y *P. euphronides* presentan valores moderados en términos de distinción evolutiva (Tabla 7) pero por su categoría de amenaza (ambas En Peligro) podrían resultar en una alta prioridad de conservación en el análisis de distinción evolutiva.

De las 54 especies incluidas para este análisis solo 28 están formalmente descritas, de las cuales según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN, siete se encuentran como Datos Deficientes, tres no han sido evaluadas, dos se encuentran en Peligro, dos como Vulnerables y 16 como preocupación menor (Tabla 7). Debido a que 35 especies en el análisis no contarían con una categoría de amenaza ya sea por ser especies candidatas, haber sido descritas recientemente y aún no contar con una evaluación o por estar como datos deficientes en la Lista Roja de la UICN, no se pudo incluir la categoría de amenaza en los análisis.

La razón principal razón por la cual se han categorizado a las especies como Preocupación Menor en la Lista Roja de la UICN (Grant *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2004, Rodríguez *et al.*, 2004a, Rodríguez *et al.*, 2004b, Rodríguez *et al.*, 2010), es la amplia distribución que presentan por lo que se asume que tienen grandes poblaciones. El descubrimiento de una alta diversidad críptica revela que las especies tienen una distribución mas restringida y por consiguiente sus poblaciones deben ser mas pequeñas, lo que implica una mayor amenaza (Elmer *et al.*, 2013). En el caso de *P. conspicillatus sensu lato*, por ejemplo, se pensaba que su distribución era Colombia, Ecuador, Perú y Brasil; los resultados de este estudio muestran que solo estaría presente en el sur de Ecuador y Norte de Perú por lo que su distribución es muy restringida. Este patrón ha sido observado en otros taxa como en

salamandras del genero *Bolitoglossa*, donde recientemente se ha descubierto una elevada diversidad críptica con distribución restringida en la Cuenca Alta Amazónica y Andes de Ecuador (Elmer *et al.*, 2013).

6.4 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

El descubrimiento de una alta diversidad críptica, muestra que en varios casos, especies que se pensaba estaban presentes en áreas protegidas, en realidad no se encontrarían en estas. Por ejemplo, se había reportado que *Pristimantis conspicillatus sensu lato* estaba en varias áreas protegidas a lo largo de su amplia distribución (Rodríguez *et al.*, 2004). En Ecuador se la había registrado en el Parque Nacional Yasuní y la Reserva de Producción Faunística Cuyabeno. Al comparar los resultados de este trabajo con el mapa actual de Áreas Protegidas del PANE, muestran que *P. conspicillatus sensu stricto* no está presente en ningún área protegida del país. Del mismo modo, especies como la ECC1 ECNC 20, ECNC 21, ECC2 y *P. citriogaster*, la cual fue reportada por primera vez en Ecuador por Camacho-Badani *et al.*, (2012) tampoco se encuentra en áreas protegidas. Sin embargo hay que tomar en cuenta que los análisis se basan solo en especímenes secuenciados y no necesariamente reflejan la distribución total de las especies.

Por otro lado en el Parque Nacional Yasuní se encuentran dos especies nuevas: ECC3 y ECC4, en la Reserva de Producción Faunística Cuyabeno se encuentra la ECNC 22; en ambas reservas también se halla *P. malkini*. La ECNC 15 está en la Reserva de la Ecológica Cotacachi Cayapas y en la Reserva Ecológica Los Ilinizas. Por ultimo, *P. lymani* se encuentra en el Parque Nacional Podocarpus.

Tener en claro los límites en la distribución interespecífica es el primer paso para tomar medidas de conservación adecuadas. El presente estudio muestra que tanto identificaciones de especies como categorías de amenaza en varios casos son erróneas. Mi

estudio muestra que varias especies del grupo interno tienen una distribución más restringida y que a menudo no están presentes en áreas protegidas. Esta nueva información hace necesaria la reevaluación de las categorías de amenaza para los grupos *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*. Para esto, también es necesario confirmar las 26 especies candidatas no confirmadas y describir todas las especies nuevas. Si es que se confirman todas las especies candidatas de este estudio, representaría un aumento del 90% en relación con el número de especies formalmente descritas en la actualidad en los complejos de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*. Esto demuestra que una gran cantidad de biodiversidad está siendo subestimada en *Pristimantis*.

La gestión de la conservación también debe tener como objetivo salvaguardar la evolución y la especiación en el futuro (Myers y Knoll, 2001). Los análisis filogenéticos pueden ser utilizados para definir una área mínima crítica de una reserva natural para que eventos de especiación puedan ocurrir, este tipo de análisis han sido realizados para otro tipo de vertebrados como lagartijas del género *Anolis* (Losos y Schluter, 2000). La pérdida de hábitat es la principal causa de extinciones en anuros. La evolución de una especie puede tomar millones de años y puede ser necesario el mismo tiempo en ser remplazada (Barracough y Davies, 2005). Es por esto que el análisis de distinción evolutiva como el realizado en el presente estudio nos da pautas para priorizar taxa desde un punto de vista filogenético, manteniendo la riqueza genética de los grupos.

7. CONCLUSIONES

Los grupos de especies *Pristimantis conspicillatus*, *P. rhabdolaemus* y *P. affinis* podrían ser un complejo de hasta 26 posibles especies nuevas de las cuales cuatro son especies candidatas confirmadas.

El grupo de especies *Pristimantis peruvianus sensu* Hedges *et al.* (2008) deja de tener ese nombre debido a que la secuencia que dio nombre al grupo es una identificación errónea de *P. reichlei*; se propone denominarlo complejo de especies *Pristimantis rhabdolaemus*. *Pristimantis peruvianus* forma parte del complejo de especies *Pristimantis conspicillatus*.

En base a patrones de coloración y a los posibles lugares de colecta del holotipo, se determinó que *Pristimantis conspicillatus* está presente en el sur oriente ecuatoriano y el norte de Perú.

Los tiempos de divergencia evolutiva muestran que los grupos de especies *P. conspicillatus*, *P. rhabdolaemus* y *P. affinis* divergieron durante el Mioceno y la mayor diversificación ocurre durante el Plioceno e inicios del Pleistoceno.

Las prioridades de conservación en base a la distinción evolutiva muestran a una especie aún no descrita del bosque Atlántico del Brasil como la de mayor prioridad evolutiva seguida de *P. caprifer*.

Las fichas informativas presentadas son una herramienta informativa para las especies del grupo *conspicillatus* en Ecuador, lo que permite tener información confiable y de fácil acceso.

8. RECOMENDACIONES

Los avances moleculares permiten un mejor entendimiento de la historia evolutiva y de la identidad taxonómica de las especies de *Pristimantis*. Sin embargo aún queda mucho trabajo por hacer. El secuenciamiento de las especies que se encuentran dentro del grupo *Pristimantis conspicillatus* y *P. rhabdolaemus* que no se incluyeron en este trabajo, podrían aclarar algunas de las relaciones de estos dos grupos de especies.

El estudio específico de los eventos de especiación de los grupos de especies es aún es incierto, por lo que se recomienda un análisis mas profundo para determinar las razones por las cuales estos se han diversificado.

Es importante realizar una revisión morfológica de los especímenes utilizados en este trabajo para poder confirmar las especies candidatas, realizar las descripciones correspondientes, y determinar caracteres morfológicos que nos permitan separar especies. En función a estas revisiones y sus localidades de colecta, se puede obtener una distribución mas real basada en especímenes depositados en museos. Tan solo en la colección del Museo de Zoología QCAZ existen más de 2500 especímenes del grupo de especies *P. conspicillatus* que deberían ser revisados.

Es necesario realizar una nueva evaluación de categoría de amenaza para las especies en función a los nuevos datos obtenidos y con los nuevos límites de especies y su distribución. Una vez obtenidos se pueden realizar análisis de prioridad de conservación en un contexto filogenético e incluir los riesgos de extinción de las listas rojas.

Considerando la distribución de las especies del grupo *P. conspicillatus* en el sur del Ecuador, sería conveniente impulsar la creación de áreas protegidas de diferentes categorías para que el SNAP incorpore la protección de estas especies a sus territorios.

9. LITERATURA CITADA

- Agapow, P. M., Bininda-Emonds, O. R. P., Crandall, K. A. Gittleman J. L., Mace G. M. y A. Purvis. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *Quarterly Review of Biology* 79, 161–79.
- Aleixo, A., 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58, 1303–1317.
- Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), 2nd International Symposium on Information Theory. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 267–281.
- Antonelli A., Quijada-Mascareñas A., Crawford A. J., Bates J. M., Velazco P. M. y Wüster W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. Pp. 386–404 en Hoorn C., Vonhof H., Wesselingh F. (eds.) Amazonia, Landscape and Species Evolution: a Look into the Past. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2013. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponible en: <http://amphibiaweb.org/>. (Acceso: 2013).
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard University Press, p. 447.
- Barracough, T. G. y Davies, T. J. 2005. Predicting future speciation. In Phylogeny and Conservation (Purvis, A., Gittleman, J. L. and M. Brooks, T. eds), pp. 400–418. Cambridge University Press. Barbour, T., y E. R.
- Barbour, T., y G. K. Noble . 1920. Some amphibians from northwestern Peru, with a

- revision of the genera *Phyllobates* and *Telmatobius*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 63, 395–427.
- Barbour, T. 1928. New Central American frogs. *Proceedings of the New England Zoölogical Club* 10, 25–31.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S. Ng., Peter. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. y Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 148–155.
- Bokermann, W. C. A. 1975 "1974". Três espécies novas de *Eleutherodactylus* do sudeste da Bahia, Brasil (Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 34, 11–18.
- Boettger, O. 1892. Katalog der Batrachier-Sammlung im Museum der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft in Frankfurt am Main [Frankfurt a. M.]: Gebrüder Knauer.
- Boettger, 1894, en Mole, R. R., y F. W. Urich. A preliminary list of the reptiles and batrachians of the island of Trinidad. *Journal of the Trinidad Field Naturalists Club* 2, 77–90.
- Boulenger, G. A. 1882. Catalogue of the Batrachia Salientia s. Ecaudata in the collection of the British Museum, 2nd. Ed. p. 210.
- Boulenger, G. A. 1888. On some reptiles and batrachians from Iguarasse, Pernambuco. *Annals and Magazine of Natural History*, 6, 40–43.
- Boulenger, G. A. 1896. Descriptions of new reptiles and batrachians from Colombia. *Annals and Magazine of Natural History* 6, 16–21.
- Boulenger, G. A. 1898. An account of the reptiles and batrachians collected by Mr. W. F. H. Rosenberg in Western Ecuador. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1898, 107–126.

- Boulenger, G. A. 1902. Descriptions of new batrachians and reptiles from the Andes of Peru and Bolivia. *Annals and Magazine of Natural History* 7, 394–402.
- Bradley R. 2005. Probability kinematics and bayesian conditioning. *Philosophy of Science* 72, 342–364.
- Boulenger, G. A. 1912. Descriptions of new batrachians from the Andes of South America, preserved in the British Museum. *Annals and Magazine of Natural History*. 8, 185–191
- Camacho-Badani T., Yáñez-Muñoz M. H. y Ron S. R. 2012. *Pristimantis citriogaster* Duellman, 1992 (Amphibia: Craugastoridae): First record from Ecuador, altitudinal distribution extension with distribution map and phylogram. *Check List* 513–515
- Canedo, C., y C. F. B. Haddad. 2012. Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 610–620.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T., Moritz, C., 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323, 785–789.
- Castro F., Ron S. R., Coloma L. A., Bolívar y W, Lynch J. 2004. *Pristimantis caprifer*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>.
- Cheviron, Z. A., Hackett, S. J. y Capparella, A. P., 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular*

Phylogenetics and Evolution 36, 338–357

Cochran, D. M. y Goin, C. J. 1970. Frogs of Colombia. United States National Museum Bulletin, Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. p 655.

Cope, E. D. 1866. Fourth contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 18, 123–132

Cornell Lab Ornithology, 2011. Raven pro. Version 1.4 Bioacoustic Research Program. New York, United States of America

Crawford A. y J., Smith E. N. 2005. Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35, 536–555.

da Silva, J. M. C. y Rylands, A. B., Da Fonseca, G. A. B., 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology* 19, 689–694.

Darriba D. Taboada G. L. Doallo R y Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.

Dayrat B. 2005. Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 407–415

de Queiroz, K. 2005a. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Science* 102, 6600–6607.

de Queiroz, K. 2005b. A unified concept of species and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Science* 56, 196–215.

de Queiroz, K. 2005c. Different species problems and their resolution. *Biossays* 27, 1263–1269.

- Duellman, W. E. 1978. Two new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Peruvian Andes. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 81, 65–71.
- Duellman, W. D. 1999. *Patterns of Distribution in Amphibians: a Global Perspective*. Johns Hopkins University Press. 648 pp.
- Duellman, W. E. 1992. A new species of the *Eleutherodactylus conspicillatus* group (Anura: Leptodactylidae) from northeastern Peru. *Revista Española de Herpetología* 6, 23–29.
- Duellman, W. E., y S. B. Hedges. 2005. *Eleutherodactylus* frogs (Anura: Leptodactylidae) from the Cordillera Yanchaga in central Peru. *Copeia* 2005, 526–538.
- Duellman, W. E., y S. B. Hedges. 2007. Three new species of *Pristimantis* (Lissamphibia, Anura) from montane forests of the Cordillera Yanachaga in central Peru. *Phyllomedusa* 6, 119–135.
- Duellman, W. E. y Lehr, E. 2009. *Terrestrial breeding frogs (Strabomantidae) in Peru*. NTV Science. Germany, 382 pp.
- Duellman, W. E., y J. B. Pramuk. 1999. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) in the Andes of northern Peru. *Scientific Papers. Natural History Museum, University of Kansas* 13, 1–78.
- Drummond A. J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T. y Wilson A. 2010. Geneious v5.3.4, Disponible en: <http://www.geneious.com>
- Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D. y Rambaut A. In press. Bayesian phylogenetics

- with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution*.
- Dunn E. R. 1921. Herpetological novelties. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 34, 157–162.
- Dunn, E. R. 1931. New frogs from Panama and Costa Rica. *Occasional Papers of the Boston Society of Natural History* 5, 385–401.
- Dunn, E. R. 1942. A new species of frog (*Eleutherodactylus*) from Costa Rica. *Notulae Naturae of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 104, 1–2.
- Elmer K. E., Ronald M Bonett, R. M. Wake D. B. y Loughheed S. C. 2013. Early Miocene origin and cryptic diversification of South American salamanders *Evolutionary Biology* 13, 59.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113
- Faith, D. P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61, 1–10.
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A., García, D. R. Frost, y J. A. Campbell. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294, 1–240.
- Flores, G., y L. O. Rodriguez. 1997. Two new species of the *Eleutherodactylus conspicillatus* group (Anura: Leptodactylidae) from Perú. *Copeia* 1997, 388–394.
- Flores, G., y G. O. Vigle. 1994. A new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the lowland rainforests of Amazonian Ecuador, with notes on the *Eleutherodactylus frater* assembly. *Journal of Herpetology* 28, 416–424.

- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. y Gemmell, N. J. 2007. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *Public Library of Science Biology One* 2: e1109.
- Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira, M., Cassimiro da Silva, J., Amaro, R. C., Camacho Guerrero, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C., Rodrigues, M. T., 2012a. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 826–838.
- Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S. Padial, J. M., Orrico, V. G. D., Lyra, M. L., Roberto, I. J., Kok, P. J. R., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T. R. 2012b. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 547–561.
- Fraser, L. 1858a. [Extracts from letters]. *Zoologist* 16, 5939–5942.
- Fraser L. 1858b. Mr. Louis Fraser's expedition to Ecuador and Peru extracts from letters. *Zoologist* 16, 6158–6160.
- Fraser, L. 1859a. Extracts from letters. *Ibis* 1, 113–114.
- Fraser, L. 1859b. Extracts from a letter . *Ibis* 1, 208–209.
- Fraser, L. 1859c. Extracts from a letter. *Ibis* 1, 332–333.
- Fraser, L. 1859d. Extracts from letters. *Ibis* 1, 462–464.
- Fraser, L. 1860. Extracts from letters. *Ibis* 2, 192–193.
- Frost, D. R. 2001. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.3.

Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> (acceso: 07 Julio, 2012).

- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Baina, R.H., Haas, A., Haddad, C.F., de Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., y Wheeler, W.C., 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297, 1–291.
- Funk, W. C., Caldwell, J. P., Peden, C. E., Padial, J. M., de la Riva, I., y Cannatella, D.C. 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 44, 825–837.
- Funk, W. C., Carminer, M. y Ron, S. R. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 279, 1806–1814.
- Gascon, C., Loughheed S. C. y Bogart, J. P. 1996. Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: A test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica* 28, 376–387.
- Gascon, C., Loughheed, S. C. y Bogart, J. P. 1998. Patterns of genetic population differentiation in four species of Amazonian frogs: A test of the riverine barrier hypothesis. *Biotropica* 30, 104–119.
- Gascon, C., Malcolm, J. R., Patton, J. L., Da Silva, M. N. F., Bogart, J. P. y Loughheed, S. C. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13672–13677.
- Glaw F., y Kohler, J. 1998. Amphibian species diversity exceeds that of mammals.

Herpetological review 29, 11–12.

Grant T., M. Manuel, Solís F., Ibáñez R., Jaramillo C. y Fuenmayor Q. 2010. *Pristimantis achatinus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>.

Gregory-Wodzicki, K. M. 2000 Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin*. 112, 1091–1105.

Günther, A. C. L. G. 1858. Neue Batrachier in der Sammlung des britischen Museums. *Archiv für Naturgeschichte* 24, 319–328.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165, 131–137.

Haffer, J. 1978. Distribution of Amazonian forest birds. *Bonn zoological Bulletin* 29, 38–78.

Hall, J. P. W., y Harvey, D. J., 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riordinid butterflies. *Evolution* 56, 1489–1497.

Hayes, F. E., y Sewlal, J. A. N., 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31, 1809–1818

Hedges, S. B., Duellman W. E. y Heinicke, M. P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737, 1–182.

Heinicke, M. P., Duellman, W. E. y Hedges, S. B. 2007. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 10092–10097.

Höglund, J., Shorey, L., 2004. Genetic divergence in the superspecies *Manacus*. 81

- Biological Journal of the Linnean Society*, 439–447.
- Huelsenbeck, J. P. y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Huson D. H. y C. Scornavacca. 2012. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks, *Systematic Biology* 62, 10–22.
- Ibáñez, R., y A. J. Crawford. 2004. A new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Darien Province, Panama. *Journal of Herpetology* 38, 240–244.
- Isaac, N. J. B., Turvey, S. T., Collen, B., Waterman, C. y Baillie, J. E. M. 2007. Mammals on the EDGE: conservation priorities based on threat and phylogeny. *Plos One* 2: e296.
- Jiménez de la Espada, M. 1870. Fauna neotropalis species quaedam nondum cognitae. *Jornal de Ciências, Matemáticas, Physicas e Naturaes*. Lisboa 3, 57–65.
- Huson D. H. y C. Scornavacca. 2012. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks, *Systematic Biology* 61, 1061–1067.
- Ibáñez, R., C. A. Jaramillo, y F. A. Arosemena. 1994. A new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from Panamá. *Amphibia-Reptilia* 15, 337–341.
- Killeen T. J., Douglas M, Consiglio T, Jørgense P. M. y Mejía J. 2007. Dry spots and wet spots in the Andean hotspot. *Journal of Biogeography* (Special issue) 1–17.
- Knapp S, Polaszek A y Watson M. 2007. Spreading the word. *Nature* 446, 261–262.
- Katho, K., Misawa, K., Kuma, K.-i. y Miyata, T. 2002. MAFFT : a novel method for

- rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30, 3060–3066.
- Köhler, J., y K. H. Jungfer. 1995. Eine neue Art und ein Erstnachweis von Fröschen der Gattung *Eleutherodactylus* aus Bolivien. *Salamandra* 31, 149–156.
- Köhler, J. 2000. New species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from cloud forest of Bolivia. *Copeia* 2000, 516–520.
- Lehr, E., C. Aguilar, y W. E. Duellman. 2004. A striking new species of *Eleutherodactylus* from Andean Peru (Anura: Leptodactylidae). *Herpetologica* 60, 275–280.
- Losos, J. B. y Schluter, D. 2000 Analysis of an evolutionary species-area relationship. *Nature* 408, 847–50.
- Lougheed, S. C., Gascon, C., Jones, D. A., Bogart, y J. P., Boag, P. T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 266, 1829–1835.
- Lynch, J. D. 1974. New species of frogs (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*) from the Amazonian lowlands of Ecuador. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas* 31, 1–22.
- Lynch J. D. 1975. A review of the broad-headed eleutherodactyline frogs of South America (Leptodactylidae) *Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County* 272, 1–19
- Lynch, J. D. 1976. The species groups of the South American frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *Occasional Papers of the Museum of*

Natural History University of Kansas 61, 1–24.

Lynch, J. D. 1977. A new frog (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*) from the Pacific lowlands of Ecuador. *Copeia* 1977, 282–284.

Lynch, J. D., y Hoogmoed M. S. 1977. Two species of *Eleutherodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae) from northeastern South America. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 90, 424–439.

Lynch, J. D. 1980. A taxonomic and distributional synopsis of the Amazonian frogs of the genus *Eleutherodactylus*. *American Museum Novitates* 2696, 1–24.

Lynch, J. D. 1982. Relationships of the frogs of the genus *Ceratophrys* (Leptodactylidae) and their bearing on hypotheses of Pleistocene forest refugia in South America and punctuated equilibria. *Systematic Zoology* 31, 166–179.

Lynch, J. D. 1986. Origins of the High Andean Herpetological Fauna. En: Vuilleumier F. & M. Monasterio (Eds.). High Altitude Tropical Biogeography. *Oxford University Press*. 478–499.

Lynch, J. D. 1989. The Gauge of speciation: on the frequencies of Modes of speciation. En: D. Otte & J. A. Endler (Eds.). Speciation and Consequences. SinauerAssoc. Inc. Sunderland Massachusetts 528–553.

Lynch, J. D. 1994. A new species of high-altitude frog (*Eleutherodactylus*: Leptodactylidae) from the Cordillera Oriental of Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 19, 195–203.

Lynch, J. D., y M. C. Ardila-Robayo. 1999. The *Eleutherodactylus* of the taeniatus complex in western Colombia: taxonomy and distribution. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23, 615–624.

- Lynch, J. D. y Duelman, W. E. 1980. The *Eleutherodactylus* of the Amazonian slopes of Ecuadorian Andes (Anura: Leptodactylidae). *Miscellaneous publication Museum of Natural History, University of Kansas* 69, 1–86.
- Lynch, J. D. y Duelman, W. E. 1997. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in western Ecuador: Systematics, Ecology, and Biogeography. *University of Kansas, Museum of Natural History, Special Publication* 23, 1–236.
- Lynch, J. D., y Rueda-Almonacid J. V. 1999. New species of frogs from low and moderate elevations from the Caldas transect of the eastern flank of the Cordillera Central. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23, 307–314.
- Lynch, J. D., y Myers C. W. 1983. Frogs of the *fitzingeri* group of *Eleutherodactylus* in Eastern Panama and Chocoan South America (Leptodactylidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 175, 481–572.
- Mace, G. M., Gittleman, J. L. y Purvis, A. 2003 Preserving the Tree of Life. *Science* 300, 1707–9.
- MacPhee, R. D. E., y Iturralde-Vinent, M. A., 1995. Origin of the Greater Antilles land mammal fauna 1: New Tertiary land mammals from Cuba and Puerto Rico. *American Museum Novitates* 314, 1–31.
- Maddison, W. y Mooers, A. 2009. Tuatara: Conservation priority in a phylogenetic context. [en línea]. Versión 1.1. Mesquite Project. <<http://mesquiteproject.org/packages/tuatara>> [Consultado: Noviembre 2012].
- Maddison , W. P. y Maddison D. R. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.75

- Melin, D. E. 1941. Contributions to the knowledge of the Amphibia of South America. Göteborgs Kungl. Vetenskaps-och Vitterhets-samhälles. Handlingar. *Serien B, Matematiska och Naturvetenskapliga Skrifter* 1, 1–71.
- Myers, N. y Knoll, A. H. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 5389–92.
- Noonan B. P. y Wray K. P. 2006 Neotropical diversification: The effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. *Journal of Biogeography* 33, 1007–1020
- Padial J. M, Castroviejo-Fischer S, Köhler J, Domic E. y De la Riva I. 2007. Systematics of the *Eleutherodactylus fraudator* species group (Anura: Brachycephalidae). *Herpetological Monographs* 21, 214–241.
- Padial, J. M. y I. De la Riva. 2009a. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155, 97–122.
- Padial J. M., Castroviejo-Fischer S., Köhler J, Vilà C, Chaparro J. C., y De la Riva I. 2009b. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*, 38, 431–447
- Padial, J. M.; Millares, A., De la Riva, I. y Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7, 1–16.
- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Waite, A. N., Morando, M., Yonenaga-Yassuda, Y. y Sites J. W. Jr. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 13–26.

- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., James Harris, D., Yonenaga-Yassuda y Y., Sites, J. W. Jr. 2011. Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: *Gymnophthalmidae*): ancient links between the Atlantic forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61, 446–459.
- Pennington R. T, Prado D. E. y Pendry CA. 2000. Neotropical seasonally dry forest and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27, 261–273.
- Peters, W. C. H. 1873. Über eine neue Schildkrötenart, *Cinosternon Effeldtii* und einige andere neue oder weniger bekannte Amphibien. *Monatsberichte der Königlichen Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin* 1873, 603–618.
- Pinto-da-Rocha, R., da Silva, M.B., Bragagnolo, C., 2005. Faunistic similarity and historic biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic rain forest of Brazil. *Journal of Arachnology* 33, 290–299.
- Pinto-Sánchez N. R, Ibáñez R., Madriñán S, Sanjur O.I., Bermingham E., Crawford A. J. 2012. The great American biotic interchange in frogs: multiple and early colonization of Central America by the South American genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 954–72.
- Potts, R. y Behrensmeyer, A. K. 1992. Late Cenozoic terrestrial ecosystems. En: *Terrestrial Ecosystems Through Time Evolutionary Paleoecology of Terrestrial Plants and Animals*. Behrensmeyer AK, Damuth JD, DiMichele WA eds. Chicago University Press, Chicago 419–541.
- Prothero, D. R., 1994. The late eocene–oligocene extinctions. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 22, 145–165.

- Purvis A., J. L. Gittleman y T. M. Brooks. 2005. Phylogeny and conservation. Cambridge University Press. *Conservation Biology* 10, 446 pp.
- Pyburn, W. F., y Lynch J. D. 1981. Two little-known species of *Eleutherodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae) from the Sierra de la Macarena, Colombia. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 94, 404–412.
- Pyron, R. A., y Wiens J. J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61, 543–583.
- Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer v 1.4. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rambaut, A. 2012. FigTree. Versión 1.4 <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. [Consultado: Noviembre 2012]
- Rambaut, A., Drummond, A., 2004. Tracer 1.3. University of Edinburgh, Edinburgh, UK <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>.
- Ramírez-Barahona S. y Eguiarte L. E. 2013. The role of glacial cycles in promoting genetic diversity in the Neotropics: the case of cloud forests during the Last Glacial Maximum. *Ecology and Evolution* 3, 725–738
- Rivero, J. A. 1961. Salientia of Venezuela. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*. Cambridge, Massachusetts 126, 1–207.
- Roberts, J. L., Brown, J. L., May, R. V., Arizabal, W., Schulte, R. y Summers, K. 2006. Genetic divergence and speciation in lowland and montane peruvian poison frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41, 149–164.
- Roberts, J. L., Brown, J. L., Schulte, R., Arizabal, W. y Summers, K. 2007. Rapid

diversification of colouration among populations of a poison frog isolated on sky peninsulas in the central cordilleras of Peru. *Journal of Biogeography* 34, 417–426.

Rodríguez L., Martínez J. L., Coloma L. A., Ron S. R., Castro F., Rueda J. V., Icochea J., Angulo A., Gascon C. y Cisneros-Heredia D. 2004. *Pristimantis malkini*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Descargado el 24 Abril 2013.

Rodríguez L., Martínez J. L., Coloma L. A., Ron S. R., Nogales F. y Venegas P. 2010. *Pristimantis lymani*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.

Roelants, K., Gower, D. J., Wilkinson, M., Loader, S. P., Biju, S. D., Guillaume, K., Moriau, L. y Bossuyt, F. 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 887–892.

Roig Juñent, S., Domínguez, M. C., Flores, G.E. y Mattoni, C., 2006. Biogeographic history of South American arid lands: a view from its arthropods using TASS analysis. *Journal of Arid Environment* 66, 404–420.

Romero, E. J., 1986. Paleogene phytogeography and climatology of South-America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73, 449–461.

Ron, S. R., Santos, J. C. y Cannatella, D. C. 2006. Phylogeny of the tungara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 392–403.

Santos, J.C., Coloma, L. A., Summers, K., Caldwell, J. P., Ree, R. y Cannatella, D. C. 2009. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from Late Miocene

- Andean lineages. *Public Library of Science Biology One* 7, e1000056.
- Savage, J. M. 1973. A Preliminary Handlist of the Herpetofauna of Costa Rica. University of Southern California. Los Angeles, California. 17 pp
- Savage, J. M. 1965. A new bromeliad frog of the genus *Eleutherodactylus* from Costa Rica. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 64, 106–110.
- Schwartz, A. 1967. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in the Lesser Antilles. Studies on the Fauna of Curaçao and Other Caribbean Islands. *Hague* 24, 1–62.
- Sclater P. L. 1858. List of birds collected by Mr. Louis Fraser, at Cuenca, Gualaquiza and Zamora, in the Republic of Ecuador 13p.
- Sclater, P. L. 1859a. List of birds collected by Mr. Louis Fraser at Cuenca, Gualaquiza, and Zamora in the Republic of Ecuador. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1858, 449–461.
- Sclater, P. L. 1859b. On the birds collected by Mr. Fraser in the vicinity of Riobamba, in the Republic of Ecuador. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1858, 49–556.
- Sclater, P. L. . 1859c. List of the first collection of birds made by Mr. Louis Fraser at Pallatanga, Ecuador; with notes and descriptions of new species. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1859, 135–147.
- Sclater, P. L. 1860a. List of additional species of birds collected by Mr. Louis Fraser at Pallatanga, Ecuador; with notes and descriptions of new species. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1860, 63–73.
- Sclater, P. L. 1860b. List of birds collected by Mr. Fraser in the vicinity of Quito and during excursions to Pichincha and Chimborazo; with notes and descriptions of new species. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1860, 73–83.
- Sclater, P. L. 1860c. List of birds collected by Mr. Fraser in Ecuador, at Nanegal, Calacali, Perucho, and Puellaro; with notes and descriptions of new species. *Proceedings of the*

Zoological Society of London 1860, 83–97.

Sclater, P. L. 1860d. List of birds collected by Mr. Fraser at Babahoyo in Ecuador, with descriptions of new species. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1860, 272–290.

Sclater, P. L. 1860e. List of birds collected by Mr. Fraser at Esmeraldas, Ecuador, with descriptions of new species. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1860, 291–298

Steindachner, F. 1864. Batrachologische Mittheilungen. *Verhandlungen des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien* 14, 239–288.

Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P. y Young, B. E. 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona, Spain, IUCN, Gland, Switzerland and Conservation International, Arlington, Virginia.

Smith, H. M. y Taylor, E. H. 1948. An annotated checklist and key to the Amphibian of Mexico. *Bulletin of the United States National Museum* 194, 1–118.

Tomes, R. F. 1859. Notes on a collection of Mammalia made by Mr. Fraser at Gualaquiza. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1858, 546–549.

Tomes, R. F. 1860. Notes on a second collection of Mammalia made by Mr. Fraser in the Republic of Ecuador. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1860, 211–221.

Vazquez, D. P. y Gittleman, J. L. 1998 Biodiversity conservation: does phylogeny matter? *Current Biology* 8, 379–81.

Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F. y Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative

- amphibianinventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 8267–8272.
- Werner, F. 1899. Ueber Reptilien und Batrachier aus Columbien und Trinidad. *Verhandlungen des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien* 49, 470–484.
- Wheeler, Q. G. 2004 Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359, 571–83.
- Wheeler, Q. G., Raven, P. H. y Wilson, E. O. 2004 Taxonomy: impediment or expedient? *Science* 303, 285.
- Wiens, J. J., 2007. Global patterns of diversification and species richness in Amphibians. *American Naturalist* 170, S86–S106
- Wiens, J. 2011. Re-evolution of lost mandibular teeth in frogs after more than 200 million years, and re-evaluating Dollo's law. *Evolution* 65, 1283–1296.
- Wiens, J. J., Pyron, R. A. y Moen, D. S., 2011. Phylogenetic origins of local-scale diversity patterns and the causes of Amazonian megadiversity. *Ecology Letters* 14, 643–652.
- Wiens, J. J., Morrill y M. C. 2011. Missing data in phylogenetic analysis: reconciling results from simulations and empirical data. *Systematics Biology* 60, 719–731.
- Wiens J. J. y Tiu J. 2012. Highly Incomplete Taxa Can Rescue Phylogenetic Analyses from the Negative Impacts of Limited Taxon Sampling. *PLoS ONE* 7, e42925.
- Will K. W., Mishler B. D, y Wheeler Q. D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54, 844–851.
- Young, B. E., S. N. Stuart, J. S. Chanson, N. A. Cox y T. M. Boucher. 2004. Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios del Nuevo Mundo. NatrueServe, Arlington. Virginia.

Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

10. FIGURAS

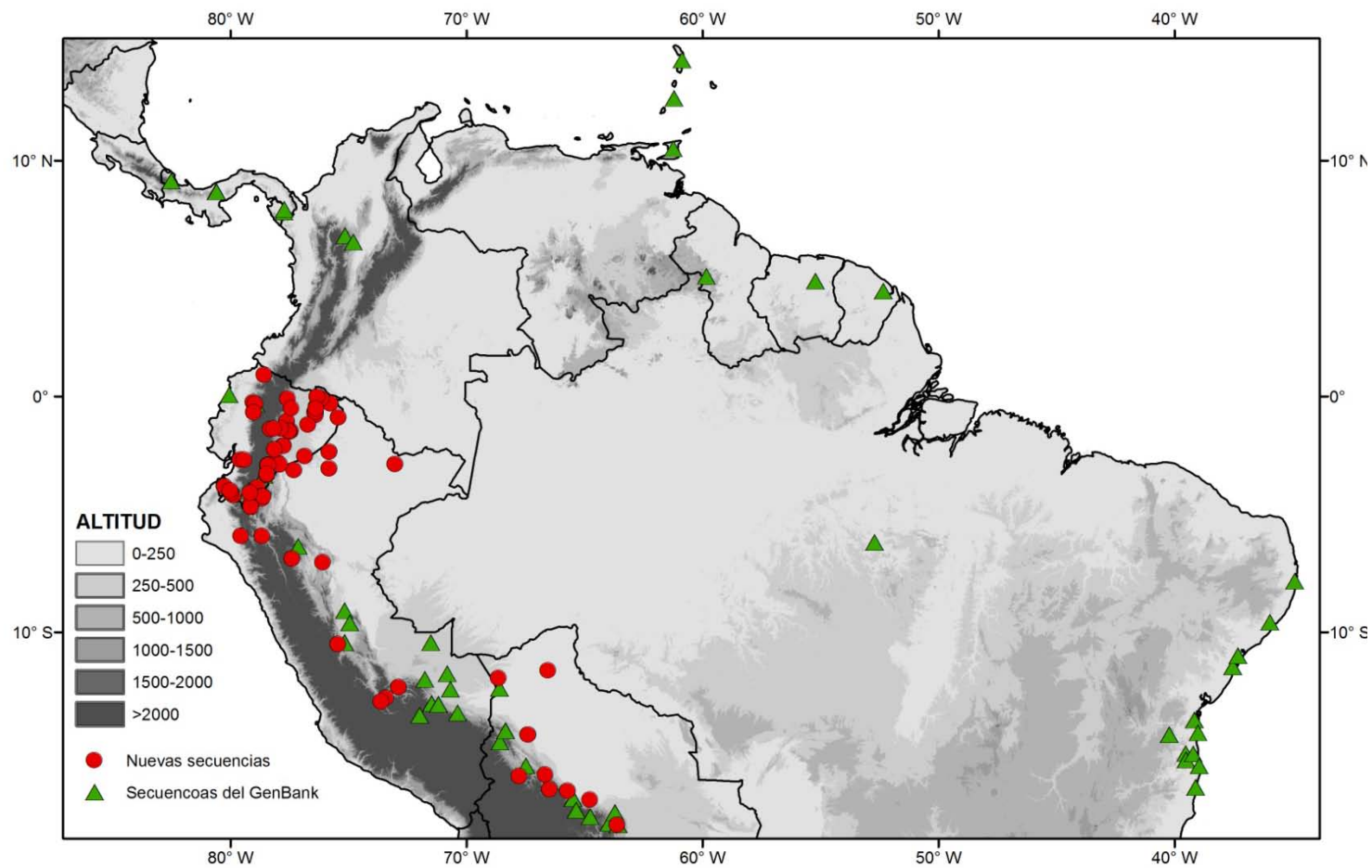


Figura 1. Mapa del área de estudio mostrando las localidades de *Pristimantis*. Los círculos rojos representan las localidades para las cuales se generaron nuevas secuencias- en el presente trabajo. Los triángulos verdes corresponden a las localidades de datos obtenidos del GenBank.

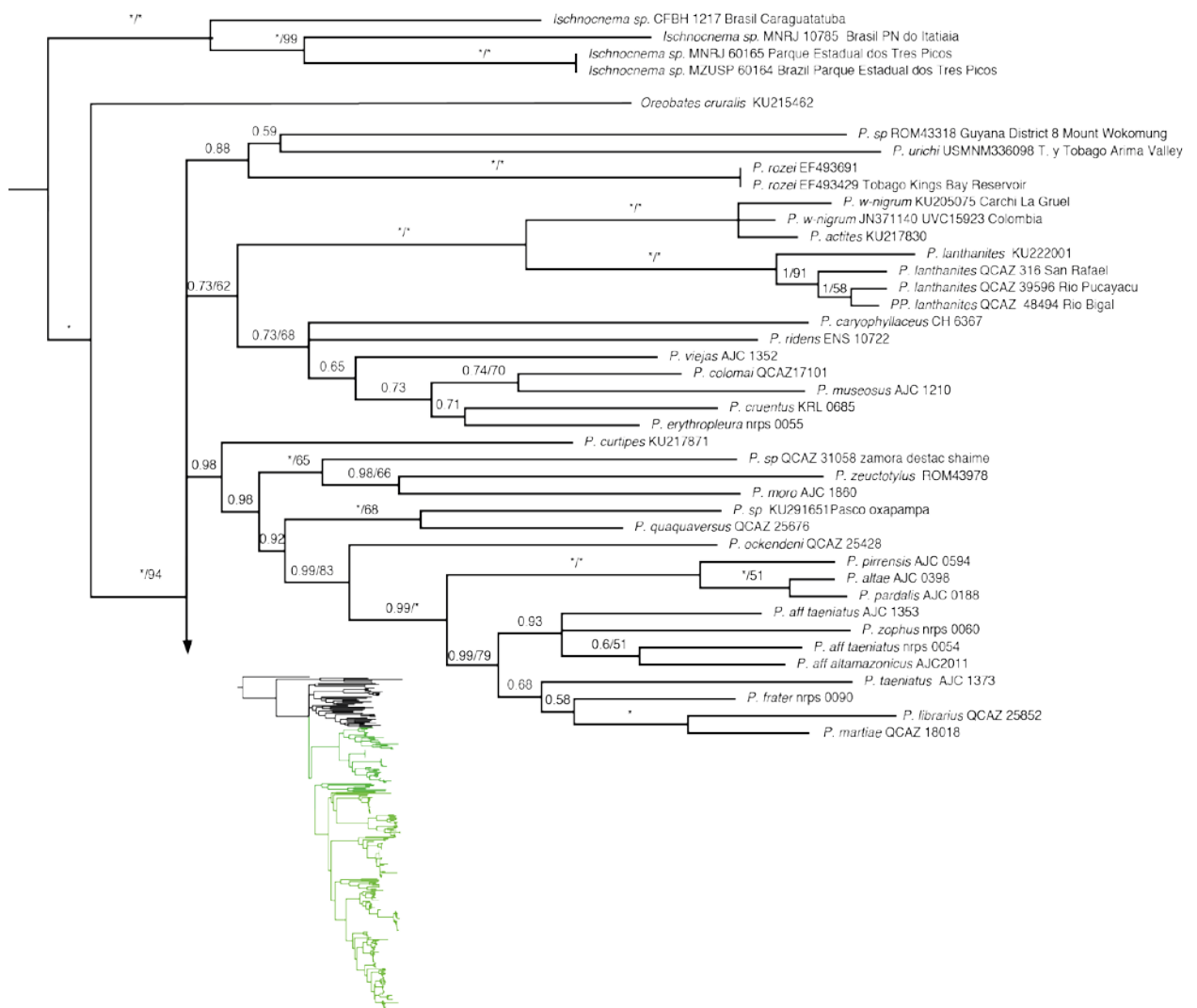


Figura 2. Filograma consenso de Inferencia Bayesiana (IB) representando las relaciones dentro del grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*. El Filograma se deriva del análisis de 267 terminales, 4013 pb de genes mitocondriales (12S, 16S, tRNA-Val y COI) y un gen nuclear (RAG1) con la estrategia de 9 particiones. Sobre las ramas se encuentran las probabilidades posteriores producto de búsquedas Bayesianas con el algoritmo de Cadena Markov Monte Carlo y valores de bootstrap, producto del análisis de Máxima verosimilitud (MV). Los valores se muestran como (IB/MV). Los asteriscos representan un valor de 1 para el análisis de IB o 100% en el caso de MV. Valores menores a 50% en el MV no son mostrados. En la barra derecha se indica la especie y los grupos de especies de cada clado.

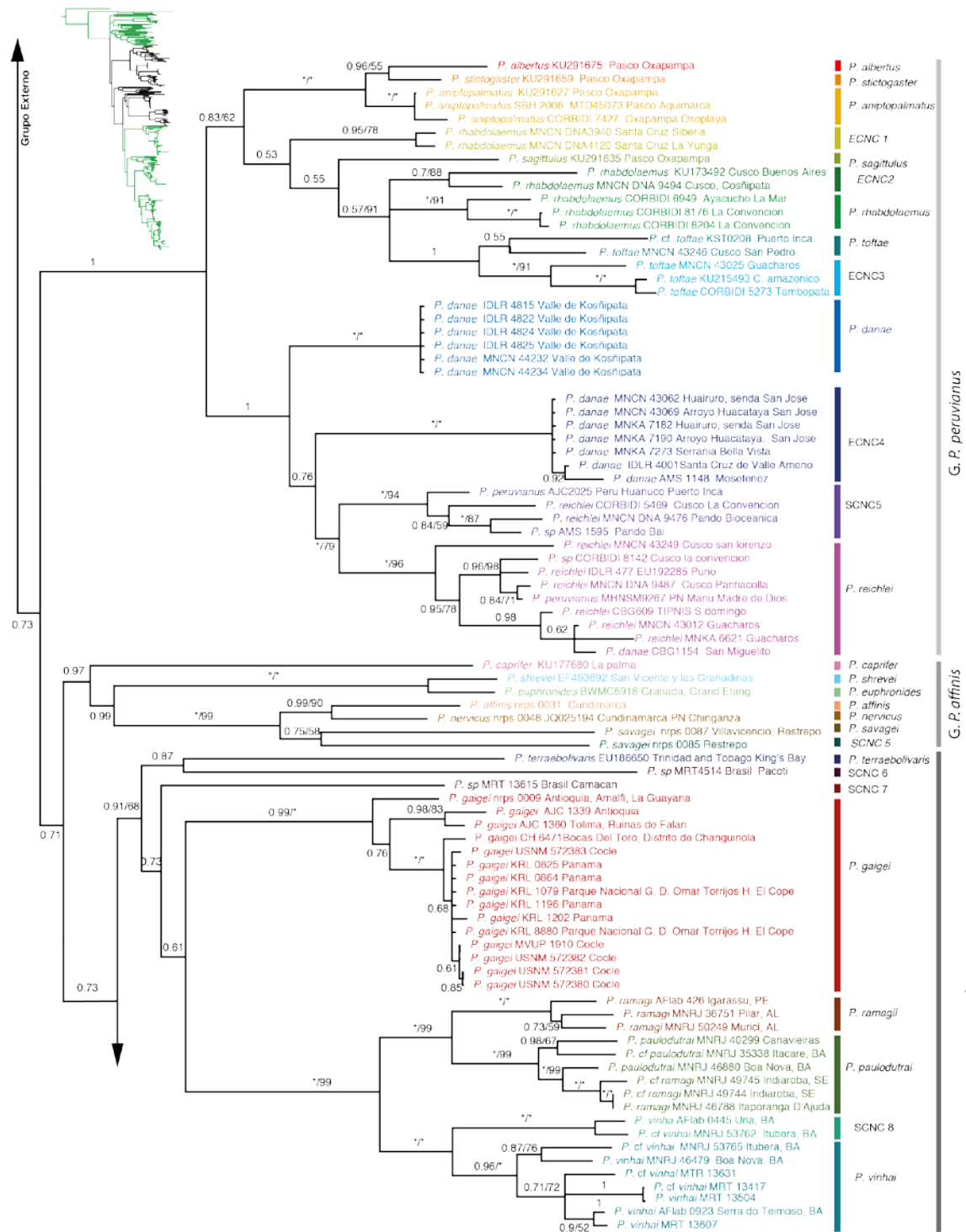


Figura 2. (continuación)

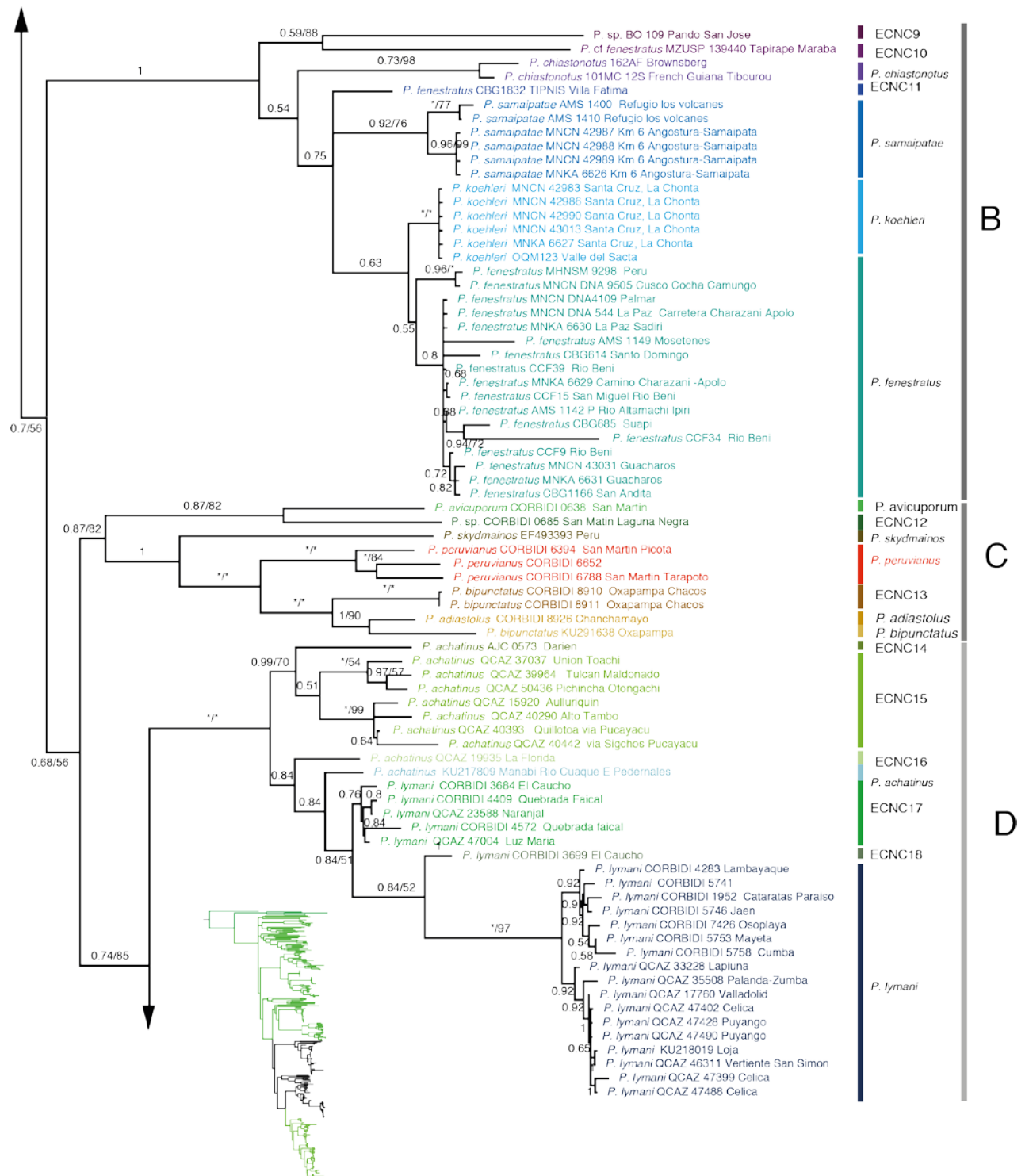


Figura 2. (continuación)

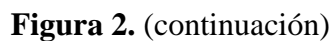


Figura 2. (continuación)

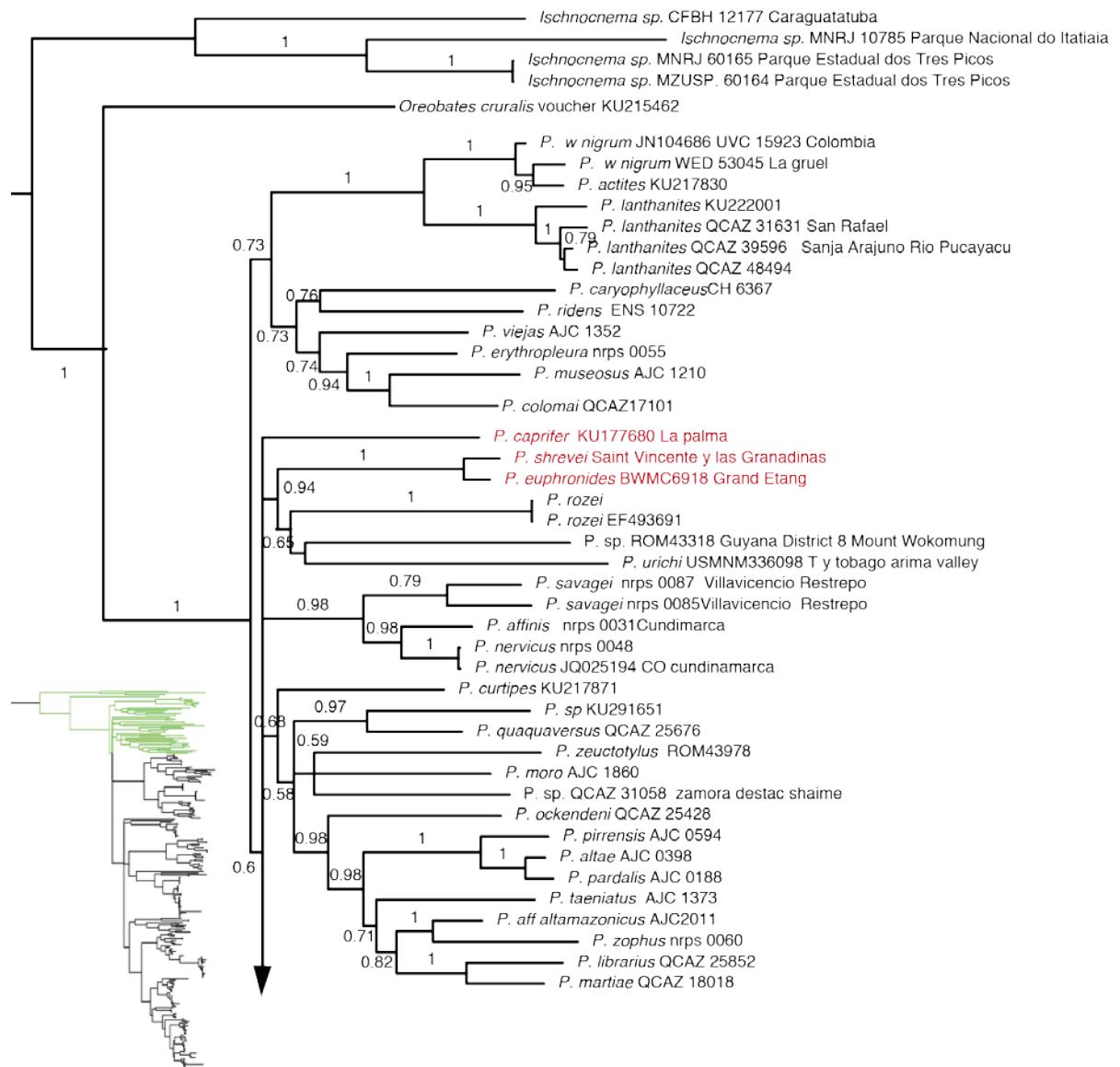


Figura 3. Filograma consenso de Inferencia Bayesiana (IB) representando las relaciones dentro del grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*. El Filograma se deriva del análisis de 267 taxa, 3332 pb de genes mitocondriales (12S, 16S, tRNA-Val y COI) con la estrategia de 6 particiones. Sobre las ramas se encuentran las probabilidades posteriores producto de búsquedas Bayesianas con el algoritmo de Cadena Markov Monte Carlo.

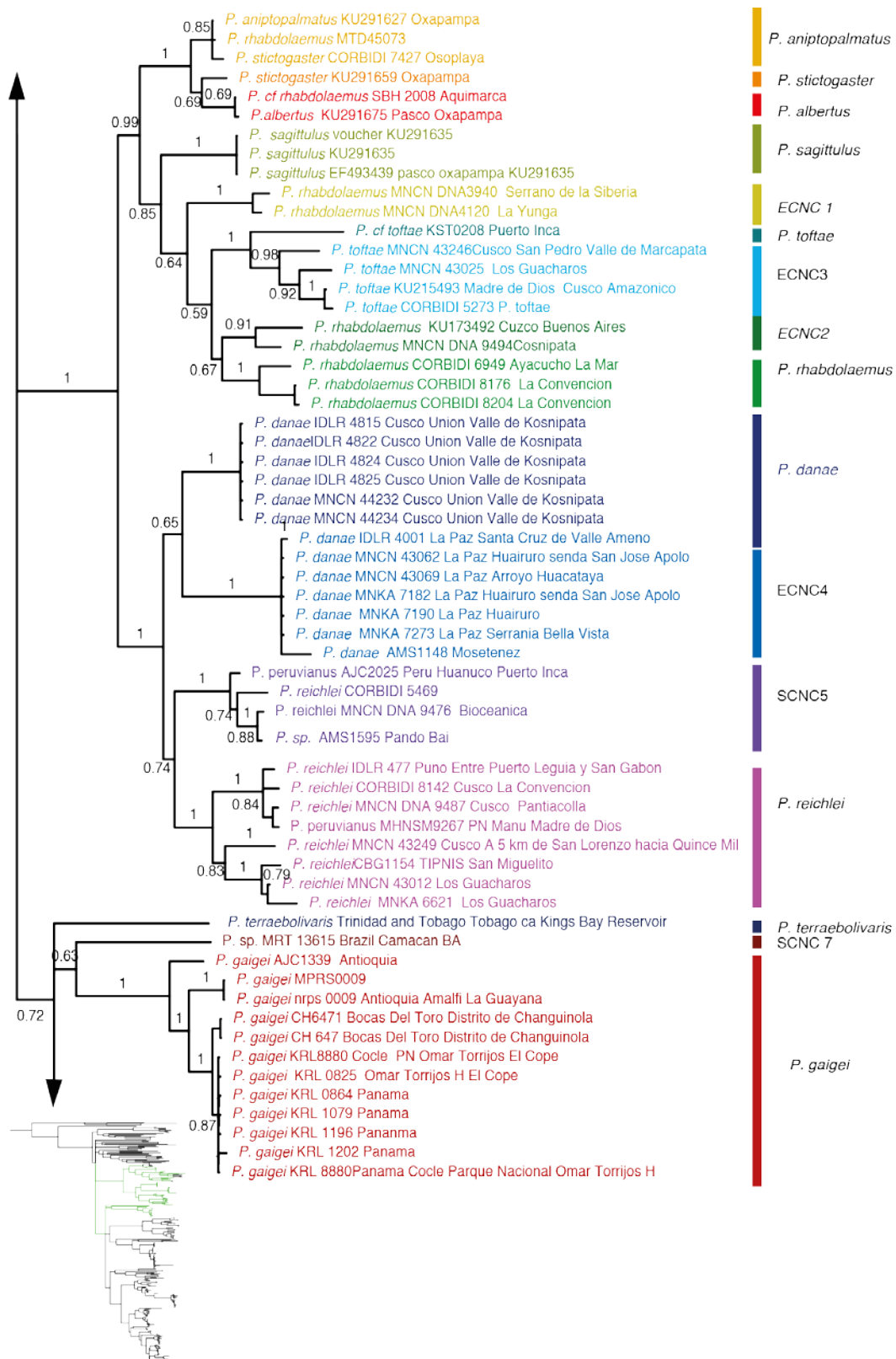


Figura 3. (Continuación)

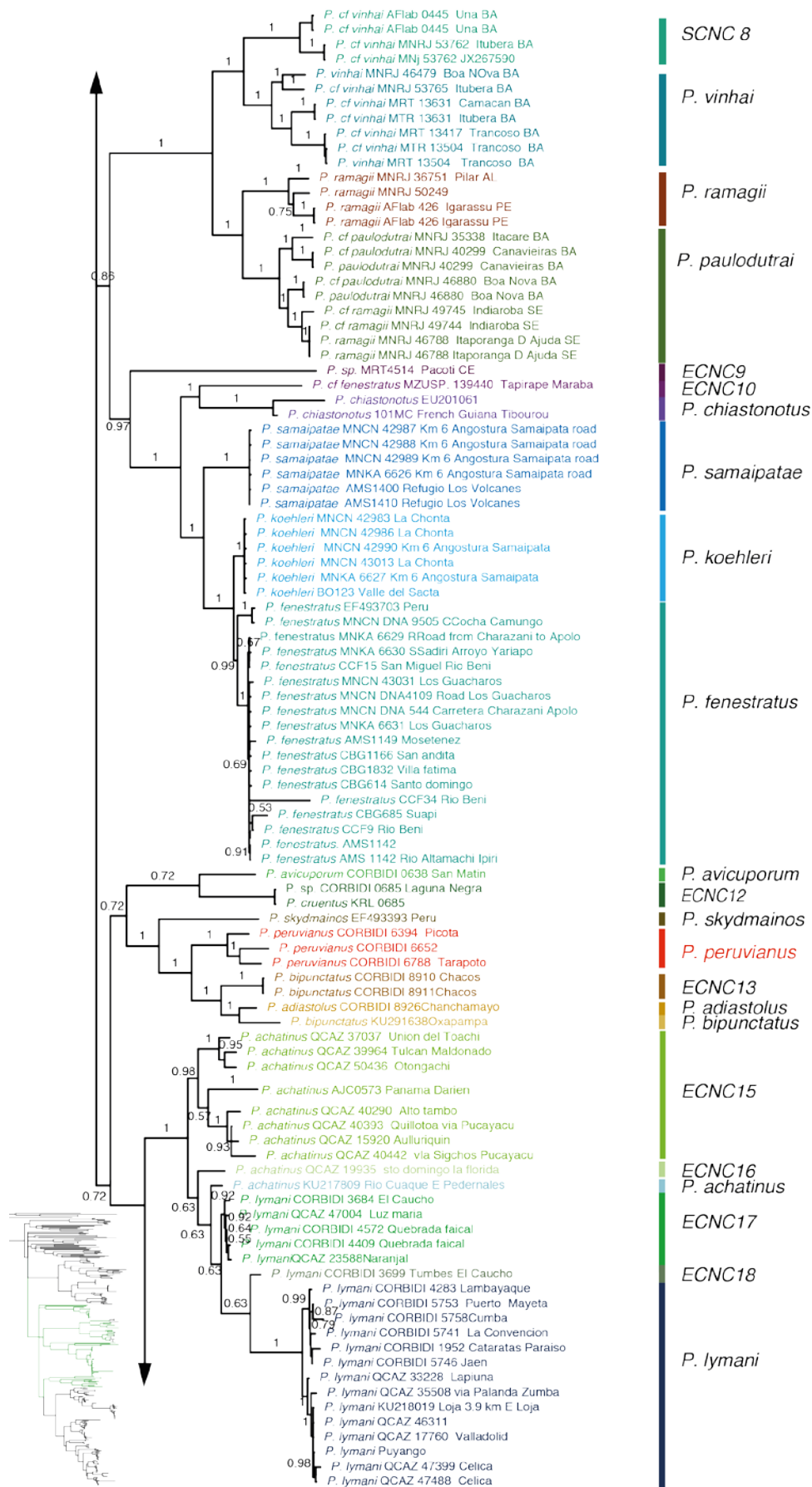


Figura 3. (Continuación)

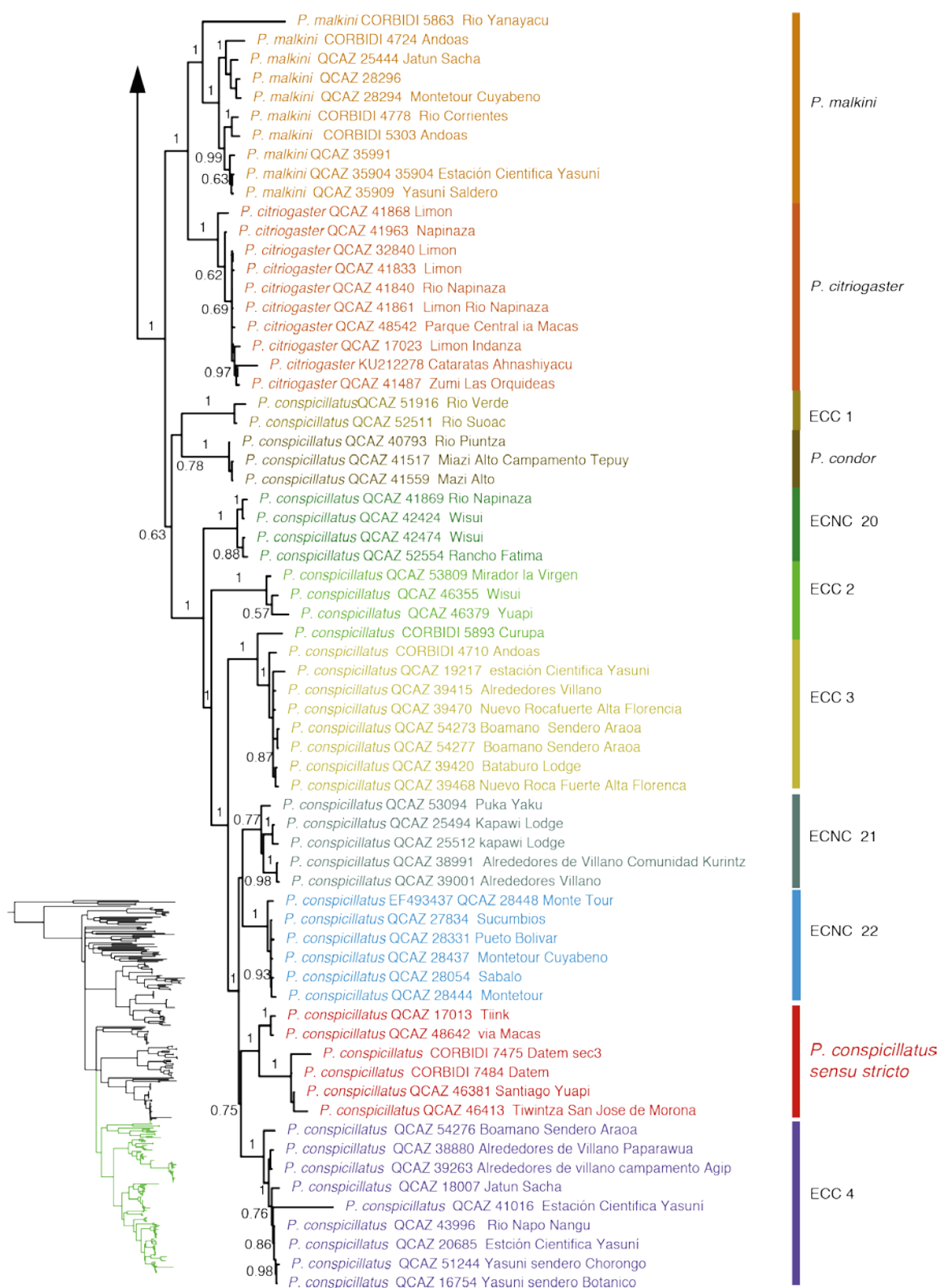


Figura 3. (continuación)

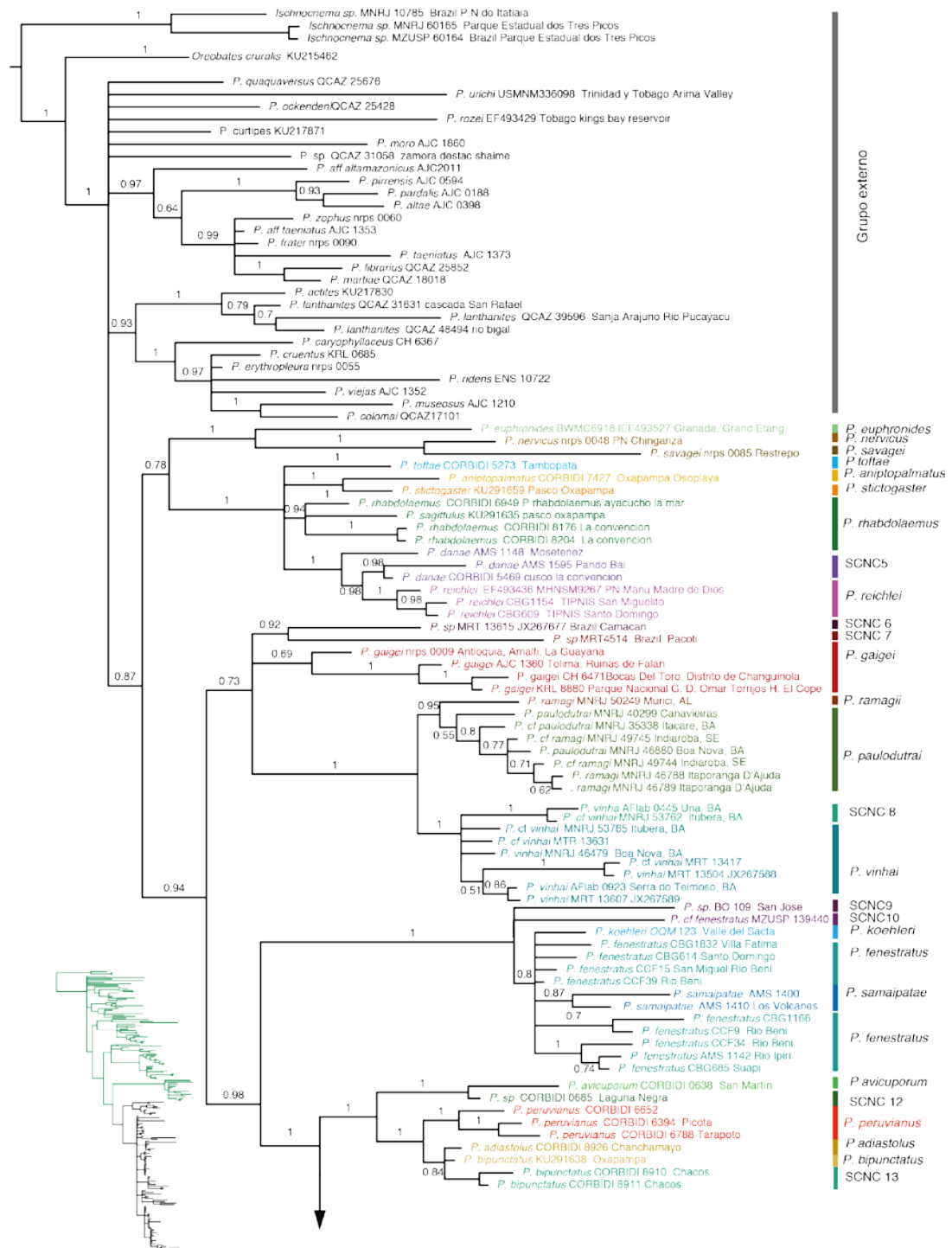


Figura 4. Filograma consenso de Inferencia Bayesiana representando las relaciones dentro del grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. peruvianus*. El Filograma deriva del análisis de 648 pb del gen nuclear RAG1 con 3 particiones. Sobre las ramas se encuentran las probabilidades posteriores producto de búsquedas Bayesianas con el algoritmo de Cadena Markov Monte Carlo.

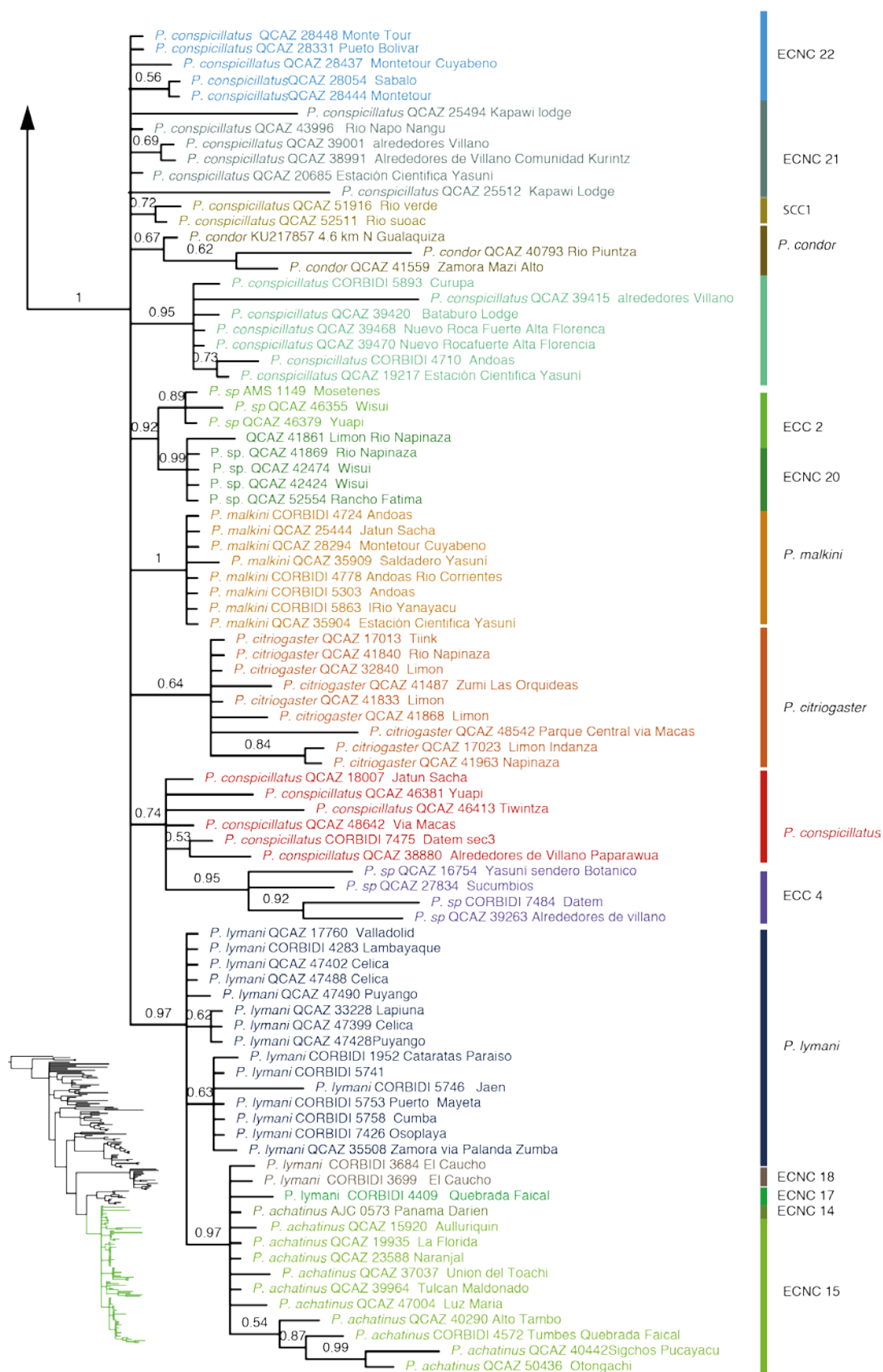


Figura 4. (Continuación)

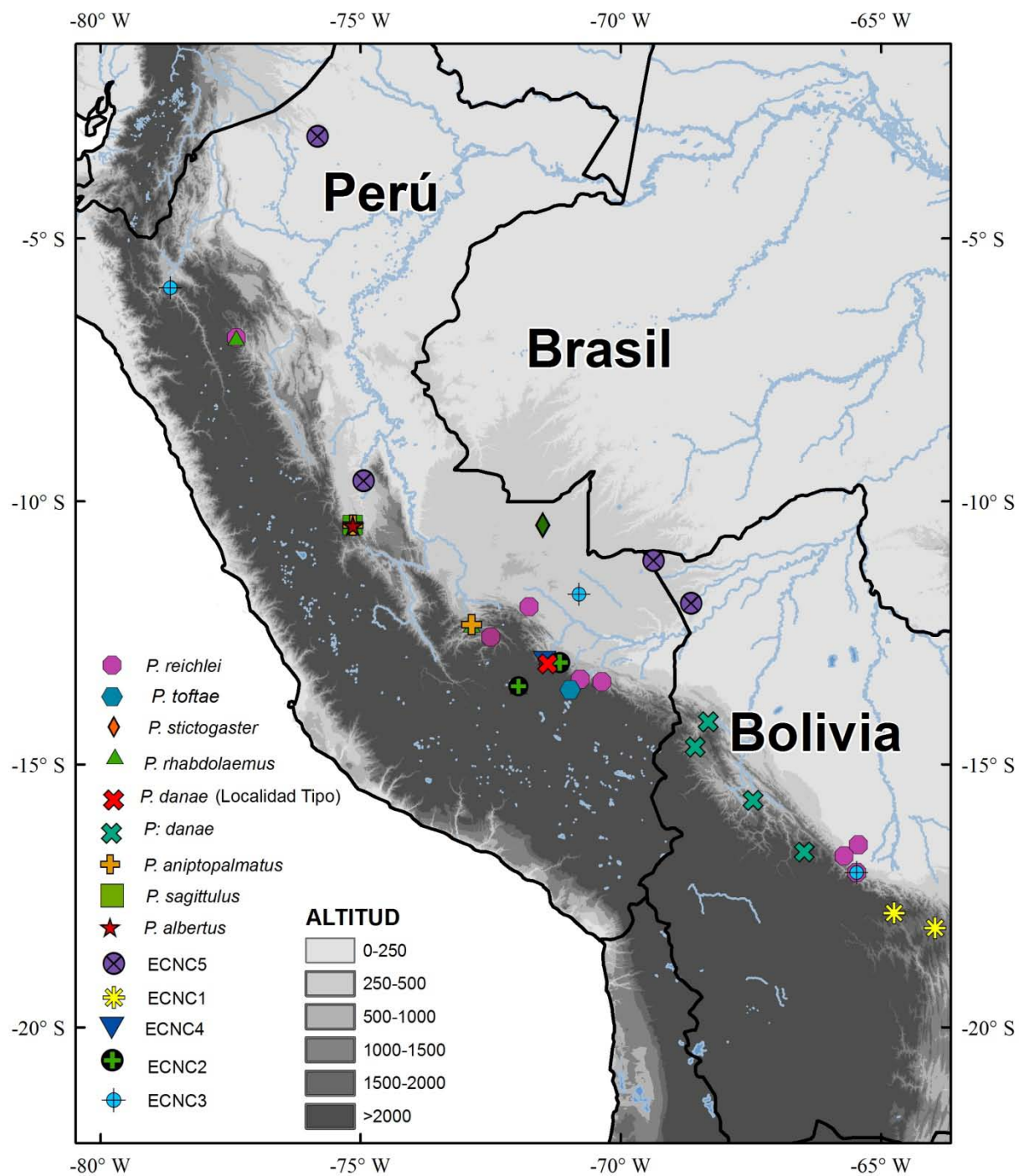


Figura 5. Mapa de distribución de los individuos analizados para el grupo de especies *P. peruvianus sensu Hedges et al., 2008*).

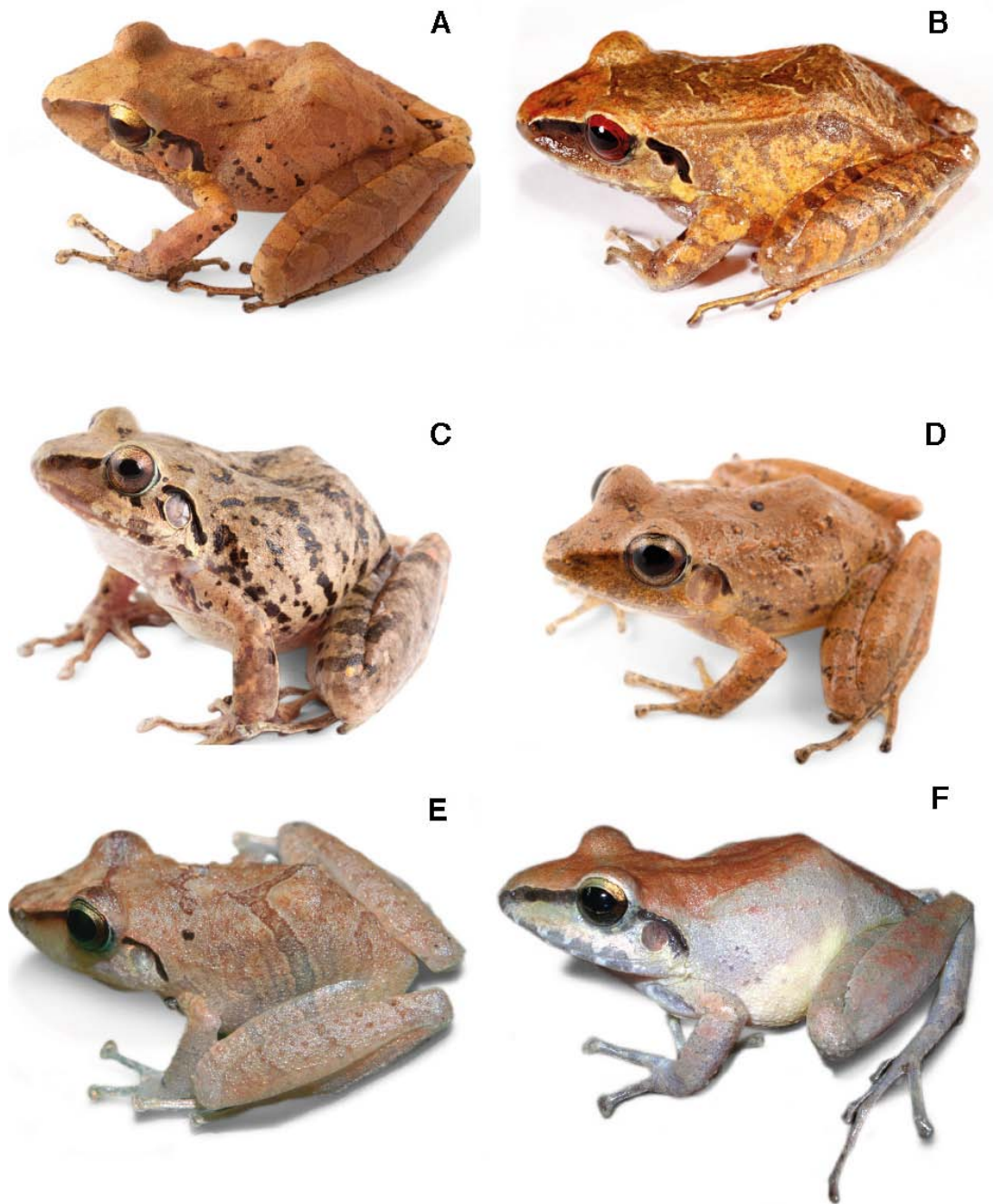


Figura 6. Especies de los grupos *Pristimantis conspicillatus* y *P. peruvianus* incluidos en el presente trabajo. (A) *Pristimantis* cf. *achatinus* (QCAZ 49632); (B) *Pristimantis* sp. (ECC1; QCAZ 51916); (C). *Pristimantis lymani* (47488); (D) *Pristimantis malkini* (QCAZ 39632) (E) *Pristimantis* sp. (ECNC5; AMS 1595); (F) *Pristimantis samaipatae*. Fotos A–D: Santiago R. Ron; fotos E y F: Arturo Muñoz Sanabria (AMS).

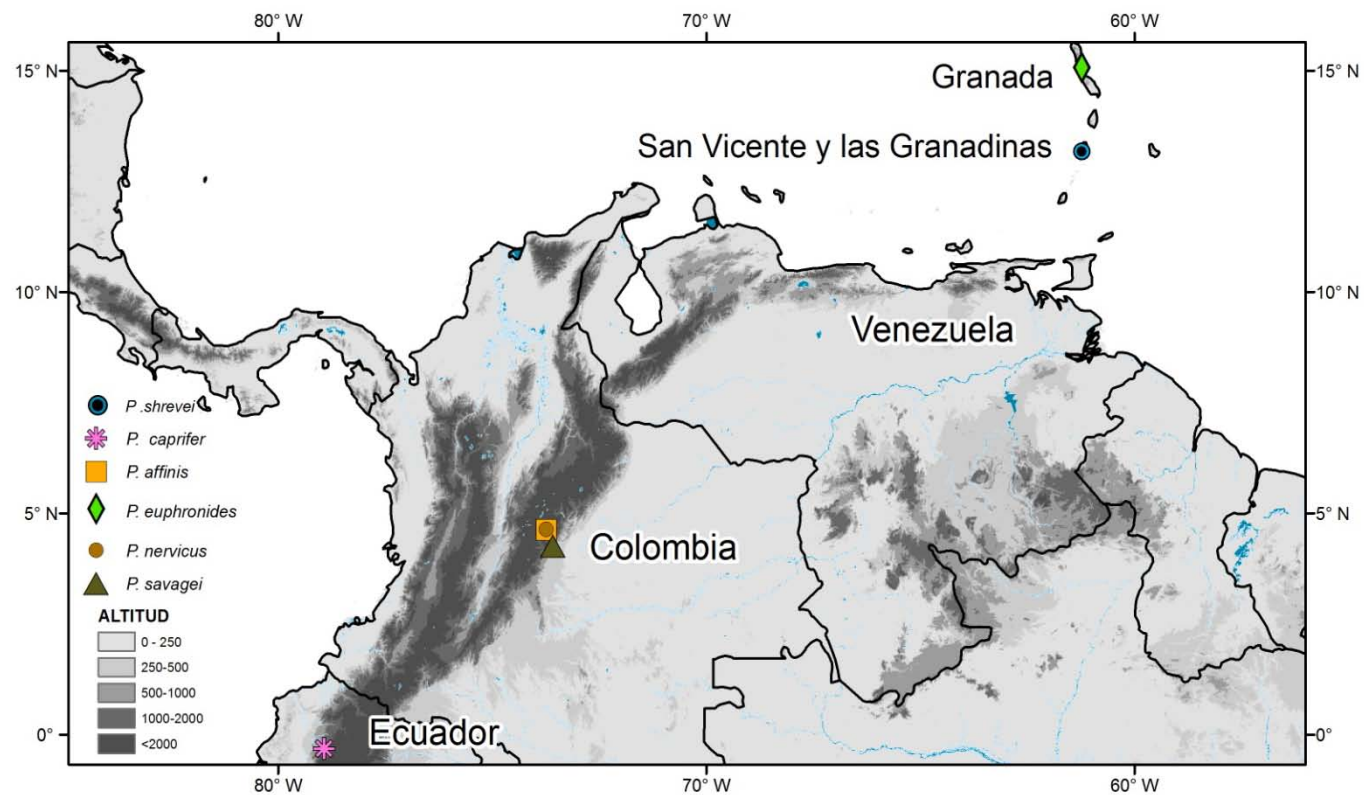


Figura 7. Mapa de distribución de los individuos analizados en el presente trabajo para el grupo de especies *P. affinis*, La secuencia de *P.*

euphronides no cuenta con un voucher por lo que las coordenadas de colecta son inciertas, sin embargo se sabe que fue colectada en la isla de San Vicente y las Granadinas.

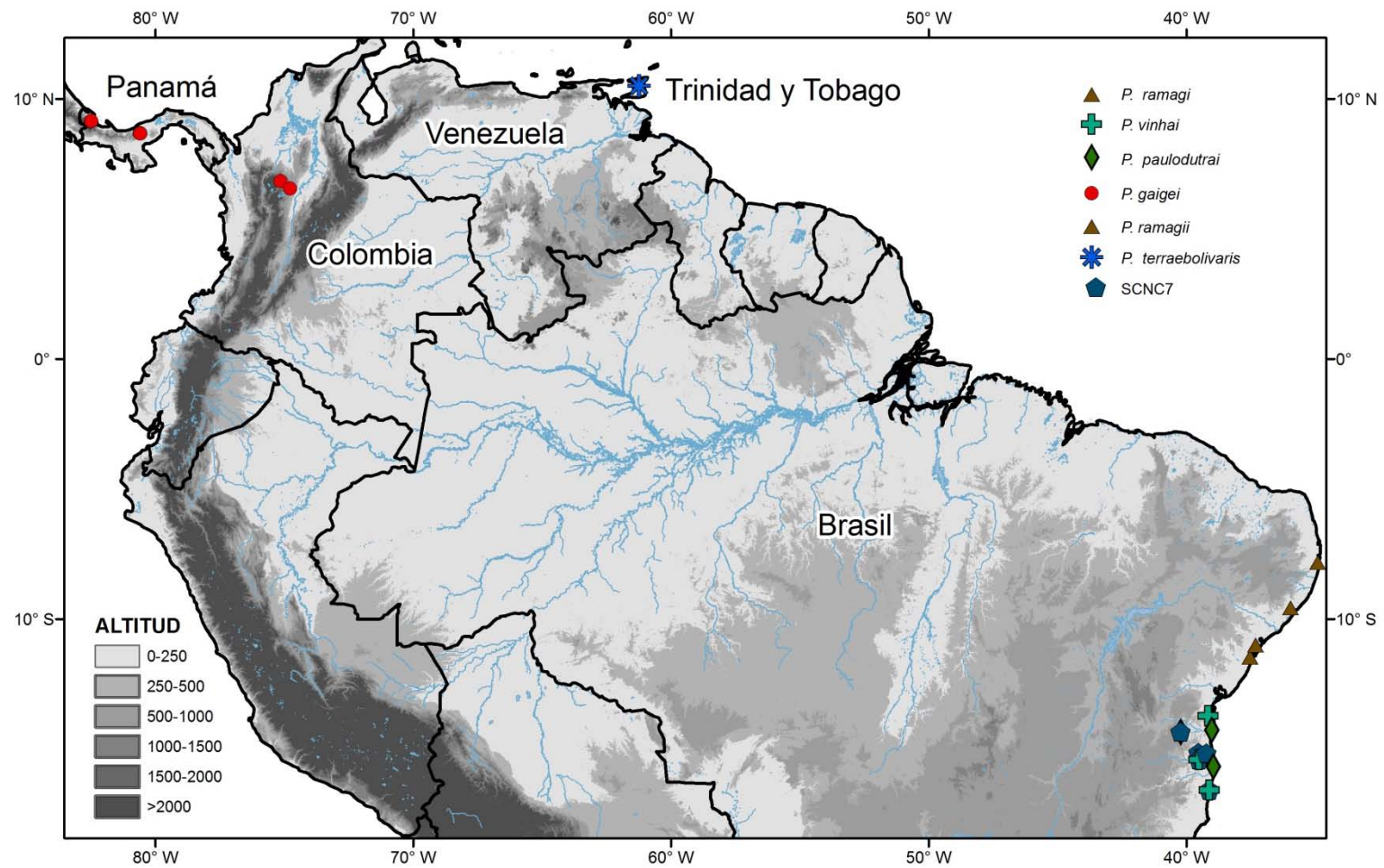


Figura 8. Mapa de distribución de los individuos utilizados en el presente trabajo de las especies del Clado A.

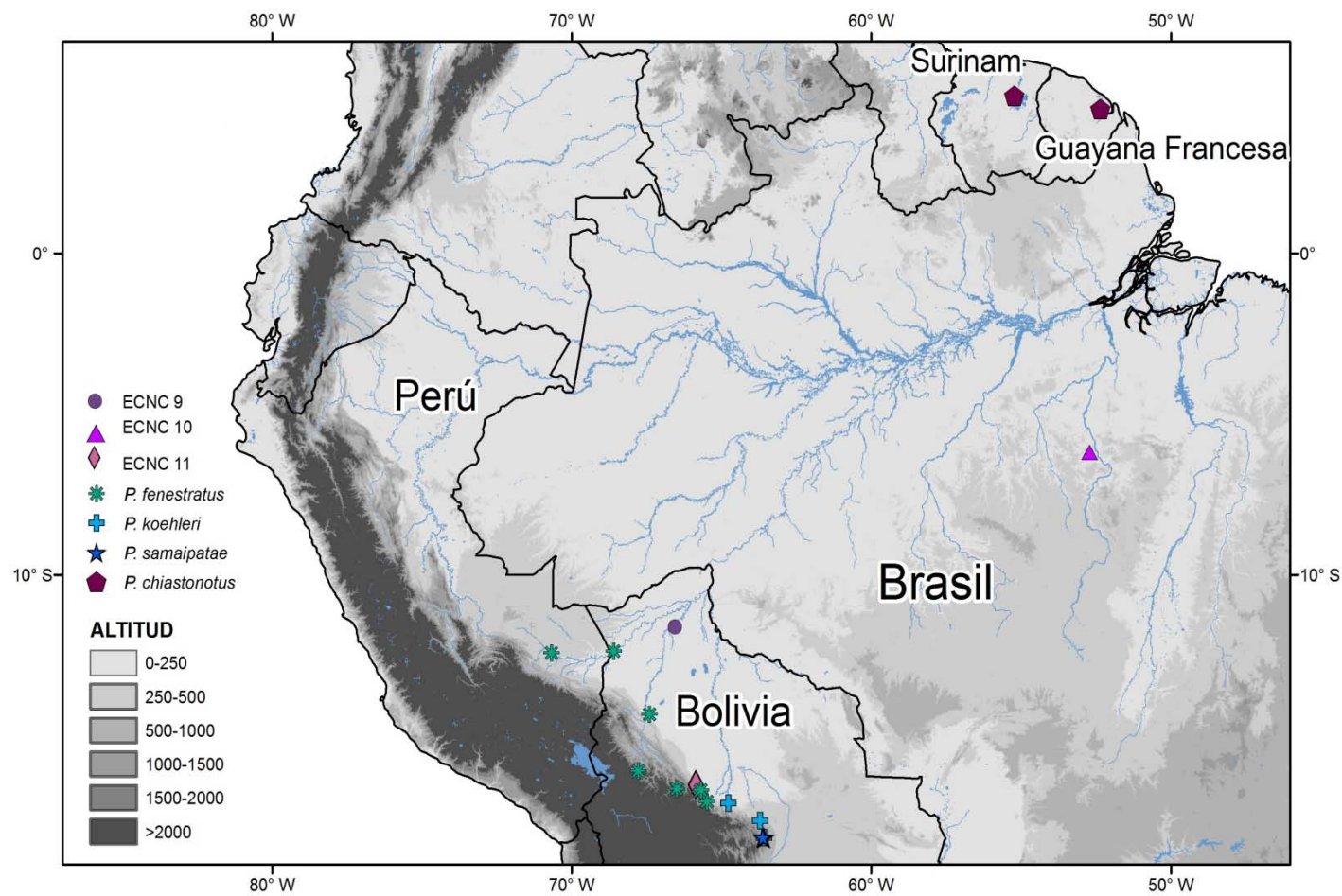


Figura 9. Mapa de distribución de los individuos utilizados en el presente trabajo de las especies del Clado B.

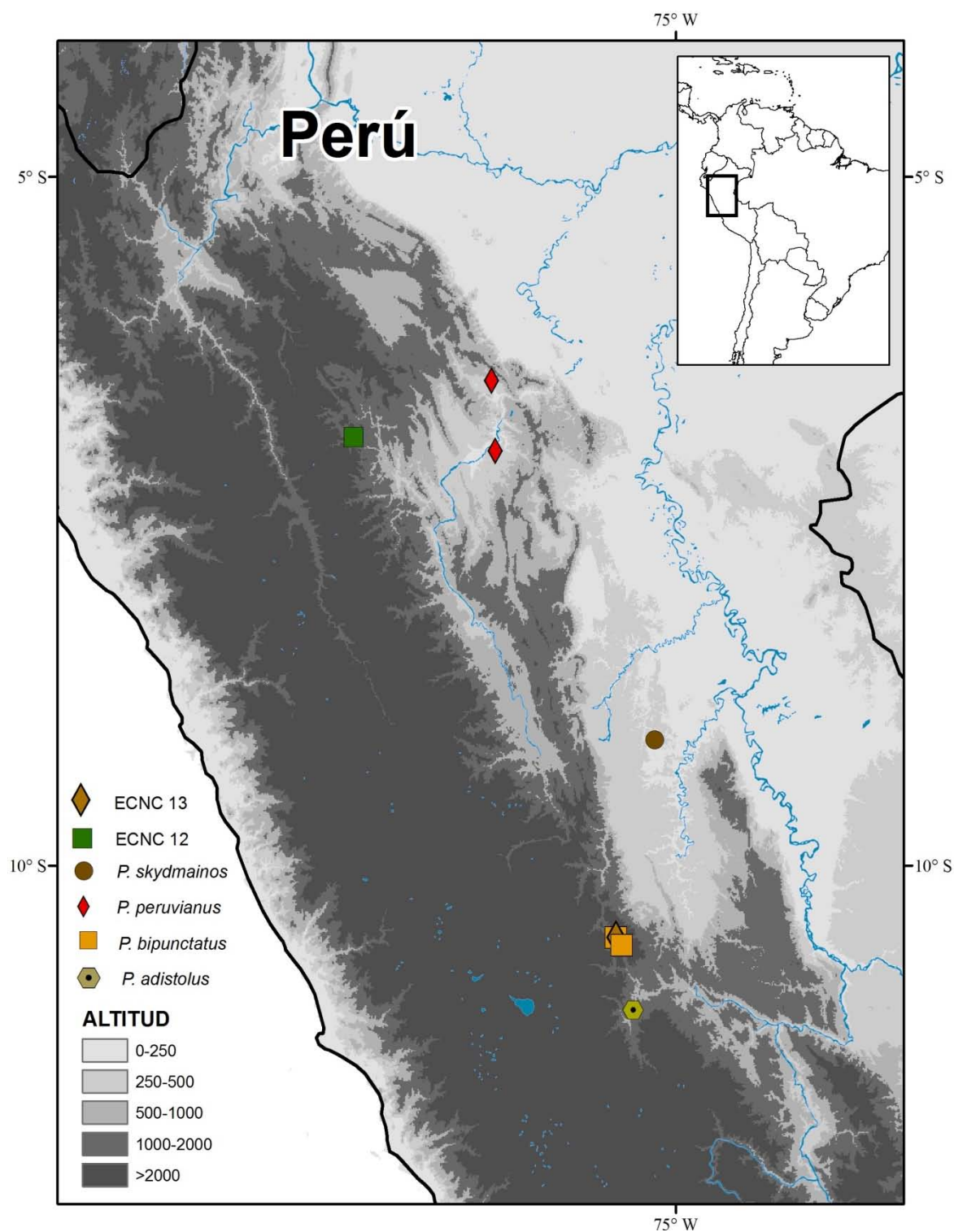


Figura 10. Mapa de distribución de las especies utilizadas en el presente trabajo para el Clado C.

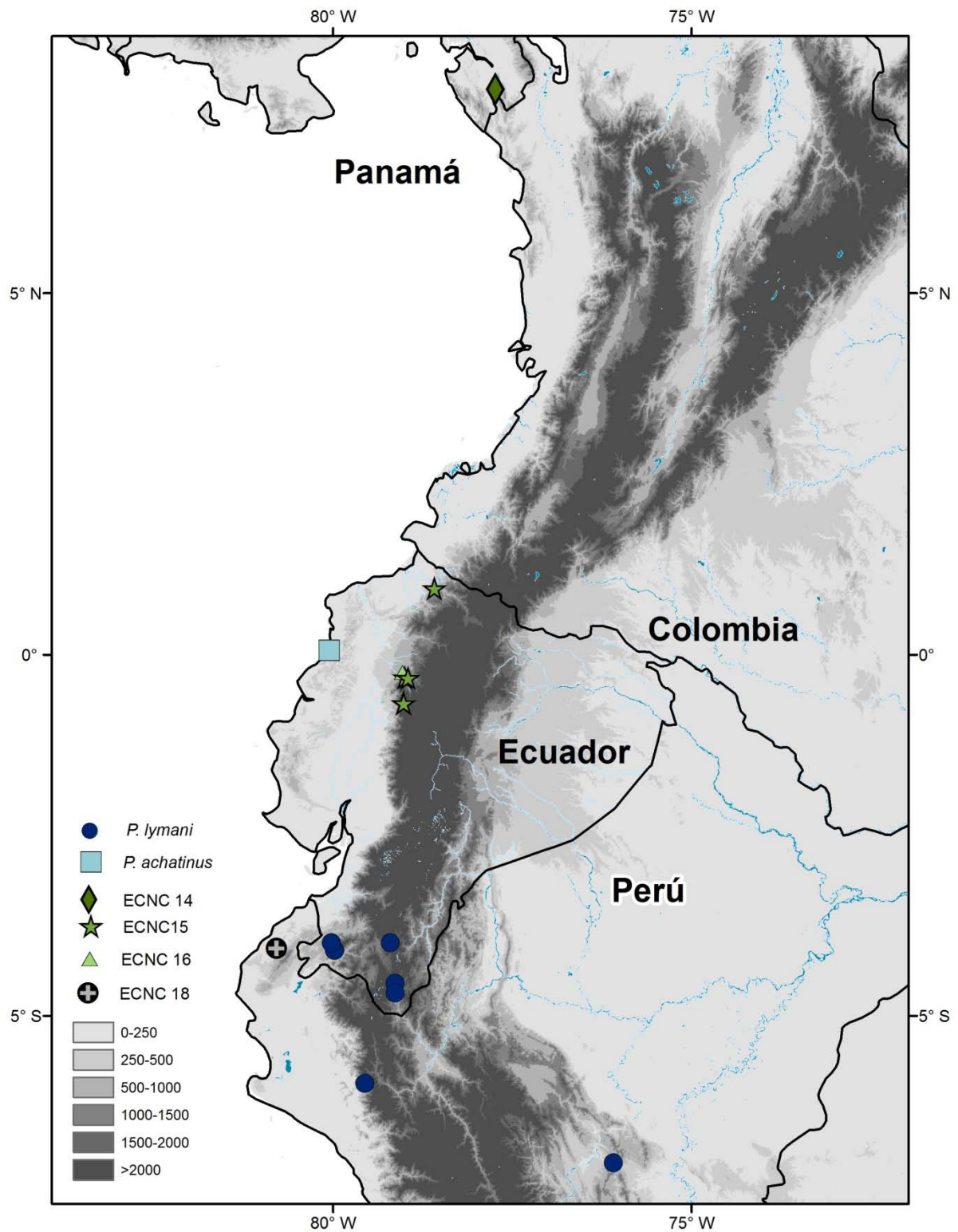


Figura 11 . Mapa de distribución de los individuos utilizados en el presente trabajo de las especies del Clado D.

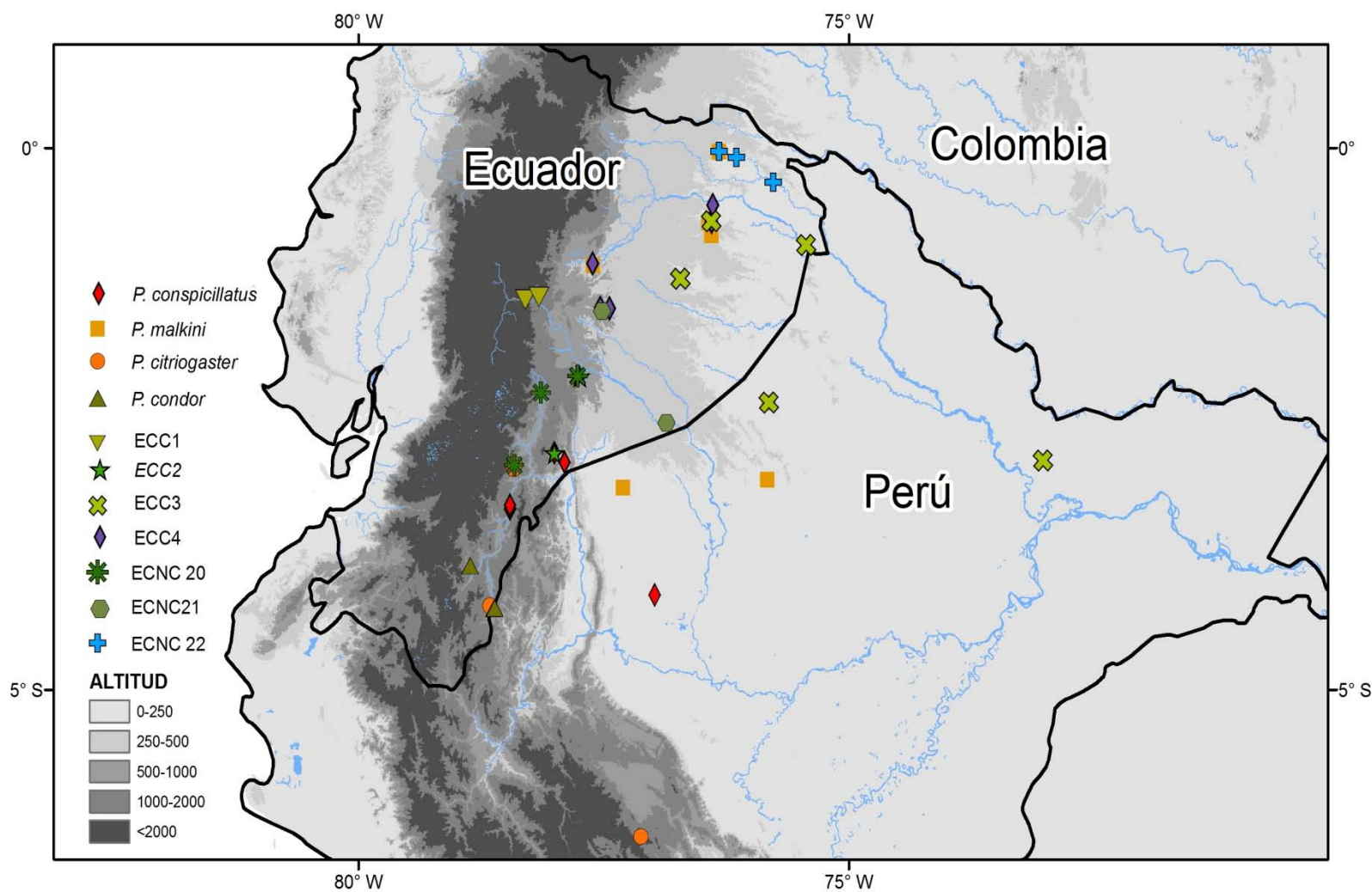


Figura 12. Mapa de distribución de las especies del complejo *P. conspicillatus* utilizados en el presente trabajo (Clado E).

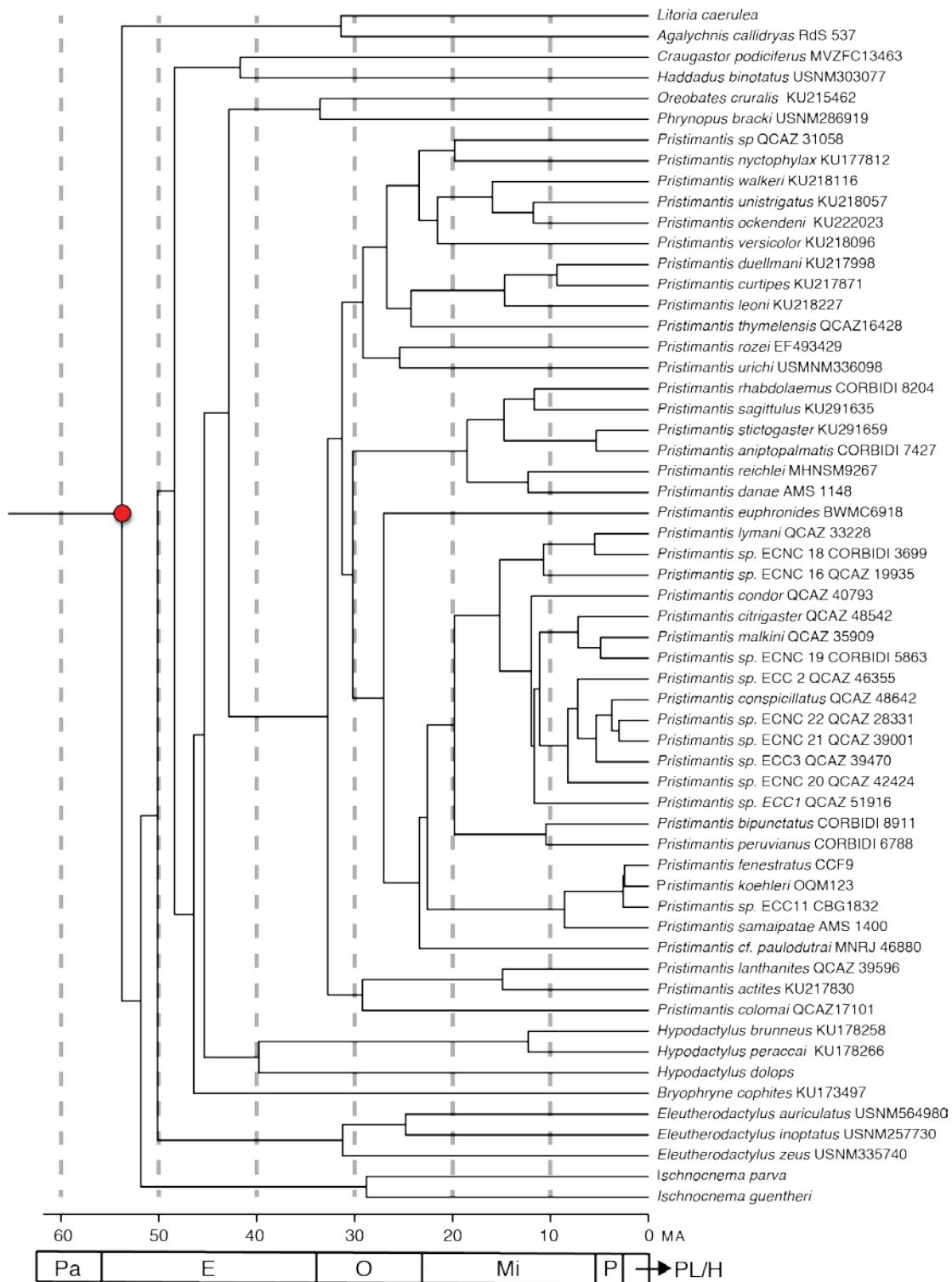


Figura 13. Cronograma derivado de un análisis de Inferencia Bayesiana con una calibración de 57Ma (Heinike *et al.*, 2007) para el nodo mas basal que separa a los hílidos de la familia Craugastoridae (círculo rojo). Épocas geológicas abreviadas: Paleoceno (Pa), Eoceno (E), Oligoceno (O), Mioceno (M), Plioceno (P), Pleistoceno (PL), Holoceno (H).

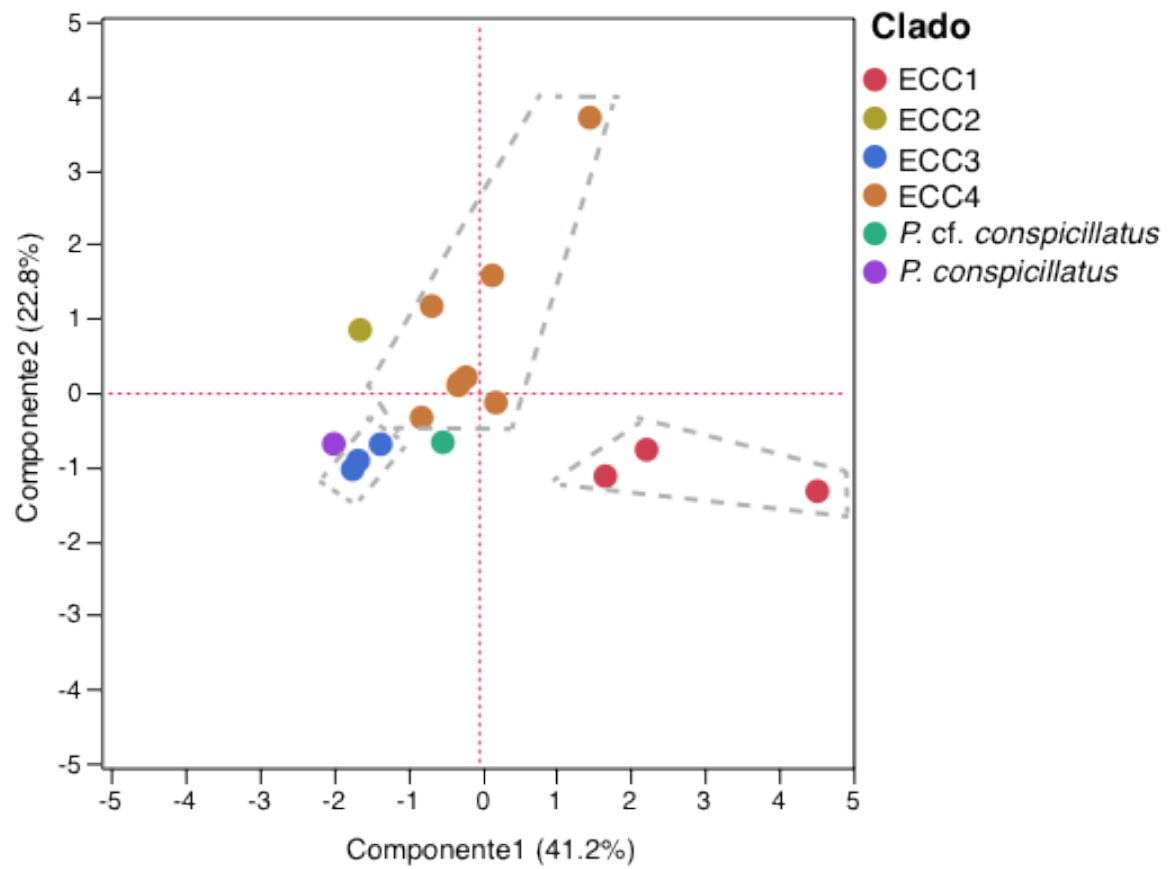


Figura 14. Proyección de las variables acústicas sobre los CP1 (principalmente tiempo de subida y duración del canto) y CP2 (principalmente frecuencia dominante y frecuencia fundamental) del complejo de especies *P. conspicillatus*. Los colores representan los clados del análisis filogenético (Fig. 2).

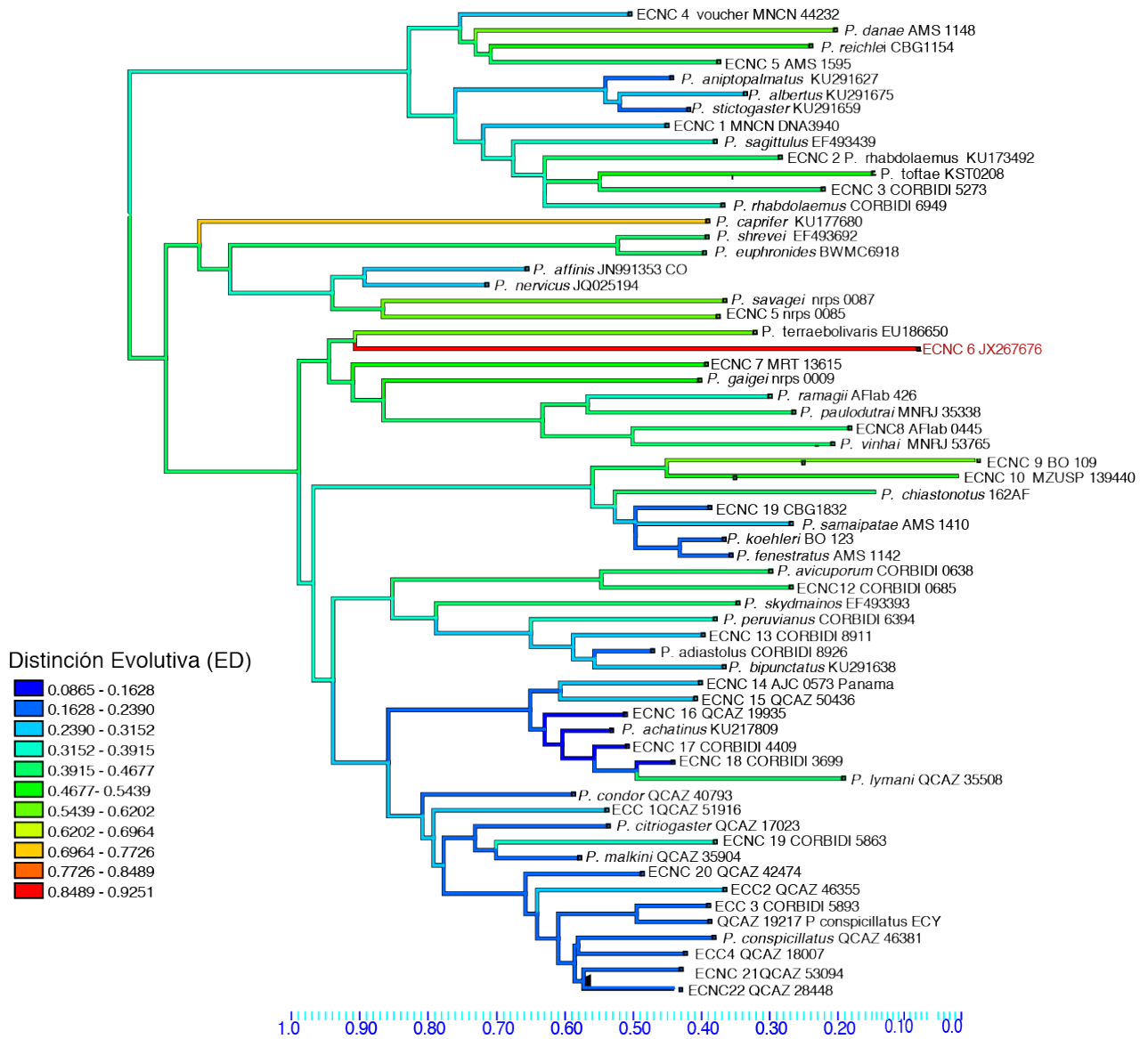


Figura 15. Árbol filogenético de 58 especies del grupo de especies *Pristimantis conspicillatus* y *P. peruvianus*. Los colores representan la prioridad de conservación en base a la distinción evolutiva (ED). Las ramas van desde azul hasta rojo; El azul representa menor prioridad de conservación y el rojo la mayor prioridad de conservación. La escala horizontal muestra la longitud de las ramas.

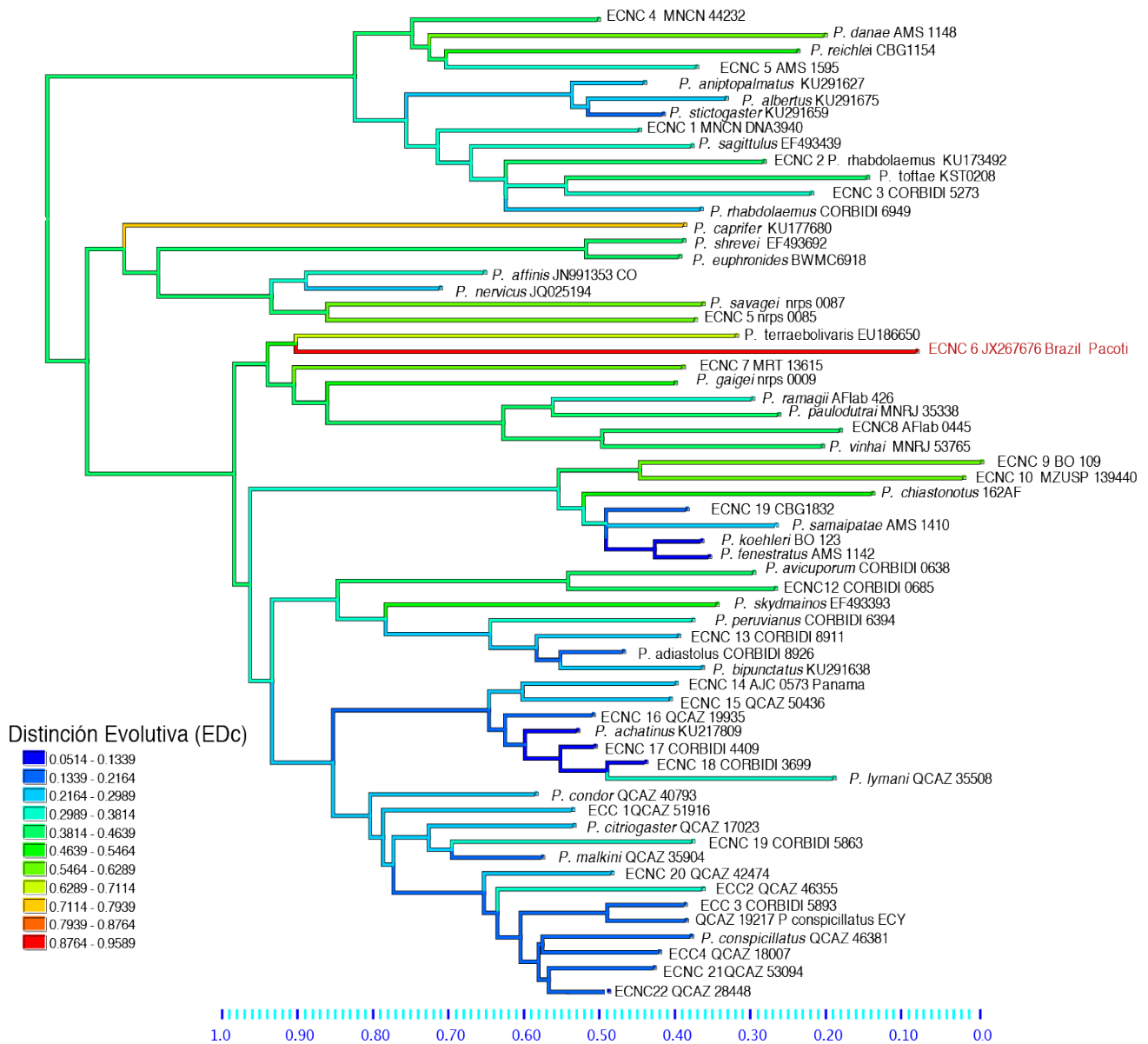


Figura 16. Árbol filogenético de 58 especies del grupo de especies *Pristimantis conspicillatus* y *P. peruvianus*. Los colores representan la prioridad de conservación en base a la distinción evolutiva (EDc). Las ramas van desde azul hasta rojo; El azul representa menor prioridad de conservación y el rojo la mayor prioridad de conservación. La escala horizontal muestra la longitud de las ramas.

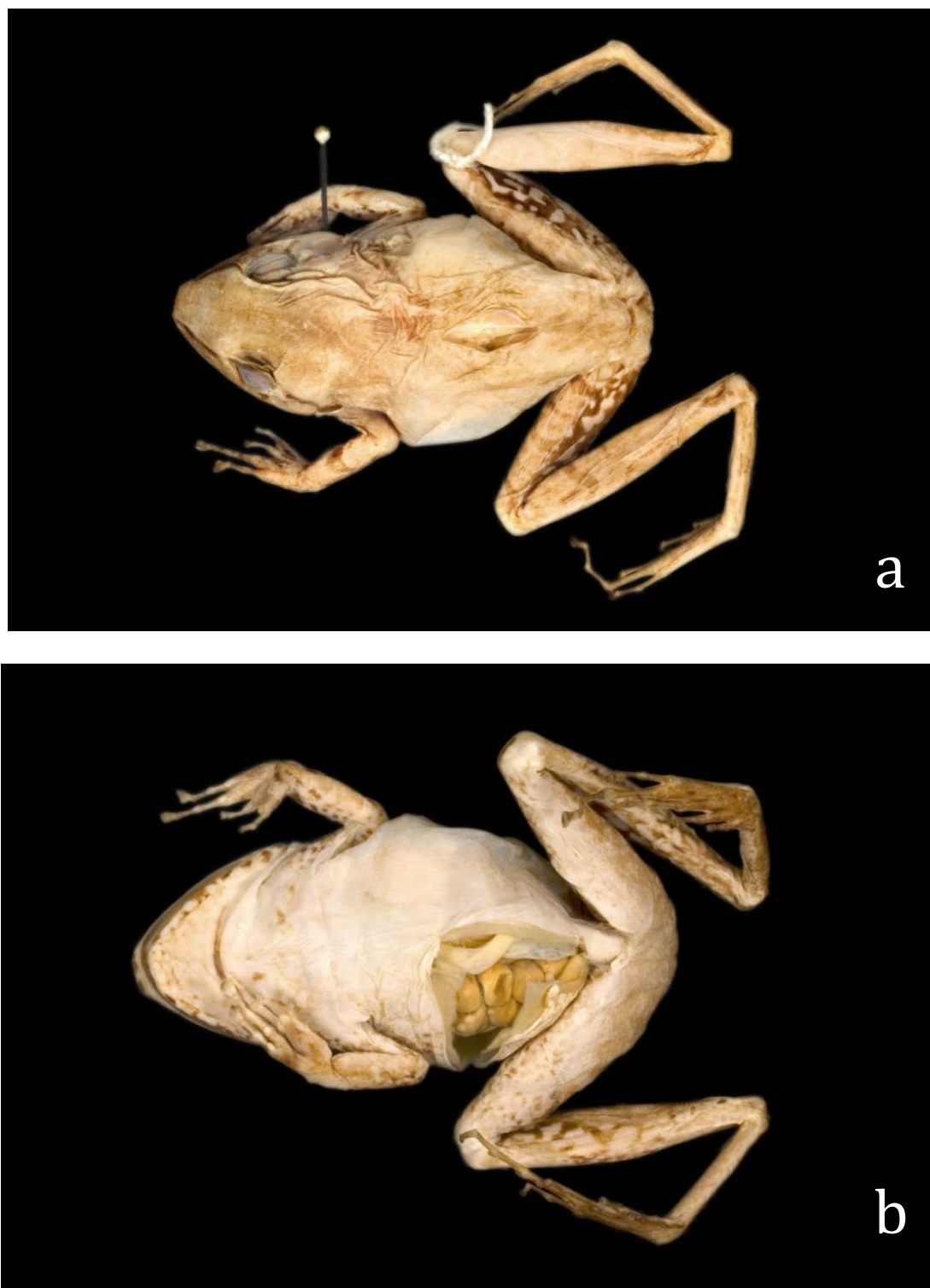


Figura 17. Fotos del holotipo de *Pristimantis conspicillatus* (BMNH 1947.2.16.20) depositado en el British Museum of Natural History. a. Vista Dorsal; b. Vista ventral.
Foto: Martín Bustamante.

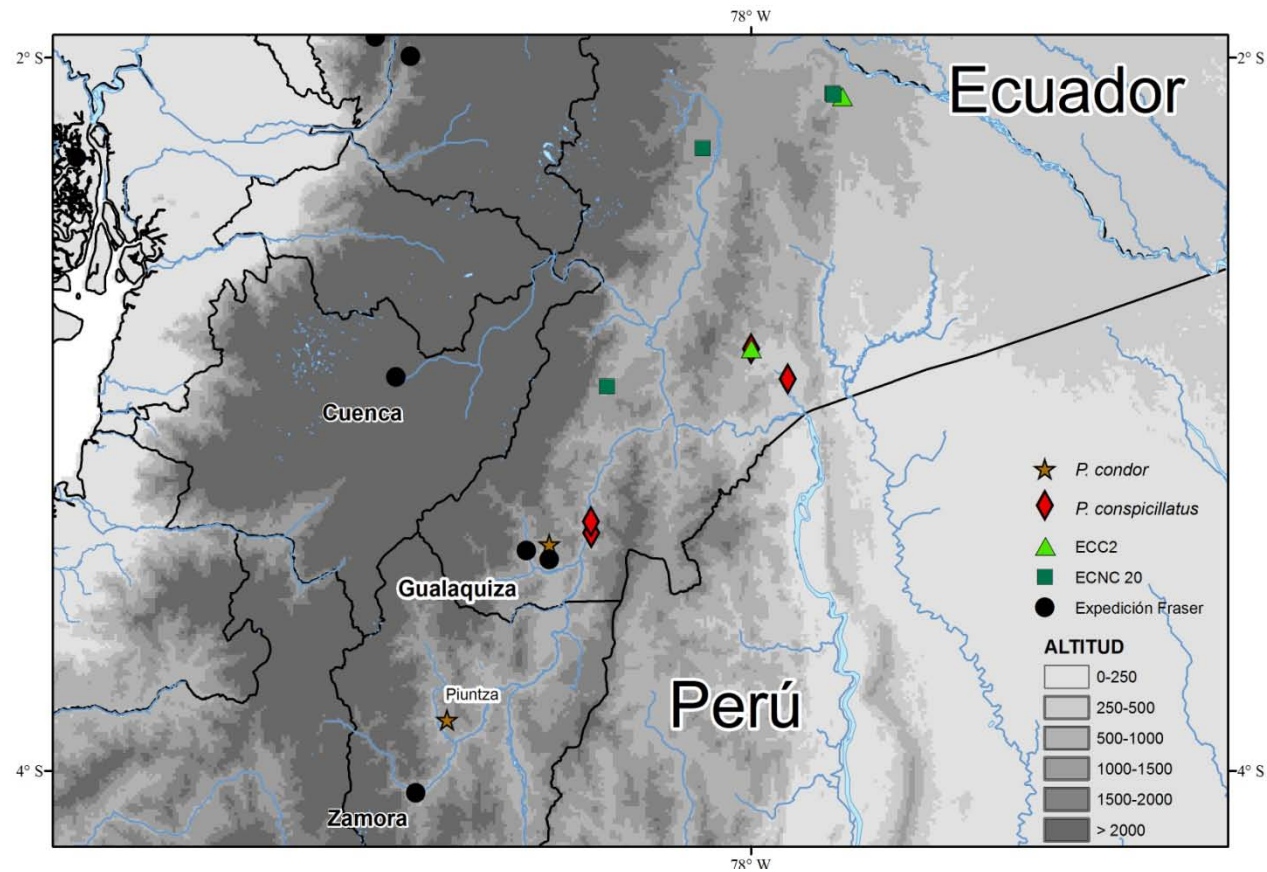


Figura 18. Mapa de la primera expedición de Luis Fraser a los Andes de Ecuador. Los puntos negros corresponden a localidades de la expedición; los colores representan clados del grupo de especies *Pristimantis conspicillatus* (Fig. 2). Los rombos rojos corresponden a *Pristimantis conspicillatus sensu stricto*.



Figura 19. Fotos de *Pristimantis conspicillatus sensu stricto* (a) Vista dorsal en vida del espécimen QCAZ 17013 colectado en el Tiink (Provincia Morona Santiago) Foto: Omar Torres -Carvajal. (b) foto en vista ventral y detalle del patrón de coloración en la pierna del mismo individuo.

10. TABLAS

Tabla 1. Especie, autor y grupo de especies utilizadas para los análisis moleculares en el presente estudio.

Especie	Autor	Grupo de especies
<i>Pristimantis caprifer</i>	Lynch, 1977	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis savagei</i>	Pyburn y Lynch, 1981	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis terraebolivaris</i>	Rivero, 1961	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis gaigei</i>	Dunn, 1931	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis ramagii</i>	Boulenger, 1888	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis paulodutrai</i>	Bokermann, 1975	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis vinhai</i>	Bokermann, 1975	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis chiastonotus</i>	Lynch y Hoogmoed, 1977	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis samaipatae</i>	Köhler y Jungfer, 1995	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis koehleri</i>	Padial y De la Riva, 2009	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis fenestratus</i>	Steindachner, 1864	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis avicuporum</i>	Duellman y Pramuk, 1999	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis skydmainos</i>	Flores y Rodríguez, 1997	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis adiaastolus</i>	Duellman y Hedges, 2007	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis bipunctatus</i>	Duellman y Hedges, 2005	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis achatinus</i>	Boulenger, 1898	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis lymani</i>	Barbour y Noble, 1920	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis condor</i>	Lynch y Duellman, 1980	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis malkini</i>	Lynch, 1980	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis citriogaster</i>	Duellman, 1992	<i>conspicillatus</i>

<i>Pristimantis conspicillatus</i>	nther, 1858	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	Lynch y Hoogmoed, 1977	<i>conspicillatus</i>
<i>Pristimantis curtipes</i>	Boulenger, 1882	<i>curtipes</i>
<i>Pristimantis viejas</i>	Lynch y Rueda-Almonacid, 1999	<i>frater</i>
<i>Pristimantis quaquaversus</i>	Lynch, 1974	<i>frater</i>
<i>Pristimantis ockendeni</i>	Boulenger, 1912	<i>frater</i>
<i>Pristimantis zophus</i>	Lynch y Ardila-Robalo, 1999	<i>frater</i>
<i>Pristimantis aff taeniatus</i>	Boulenger, 1912	<i>frater</i>
<i>Pristimantis taeniatus</i>	Boulenger, 1912	<i>frater</i>
<i>Pristimantis frater</i>	Werner, 1899	<i>frater</i>
<i>Pristimantis librarius</i>	Flores y Vigle, 1994	<i>frater</i>
<i>pristimantis martiae</i>	Lynch, 1974	<i>frater</i>
<i>Pristimantis albertus</i>	Duellman y Hedges, 2007	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis stictogaster</i>	Duellman y Hedges, 2005	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis aniptopalmatus</i>	Duellman y Hedges, 2005	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis sagittulus</i>	Lehr, Aguilar y Duellman, 2004	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis rhabdolaemus</i>	Duellman, 1978	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis danae</i>	Duellman, 1978	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis toftae</i>	Duellman, 1978	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis reichlei</i>	Padial y De la Riva, 2009	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis peruvianus</i>	Melin, 1941	<i>peruvianus</i>
<i>Pristimantis ridens</i>	Cope, 1866	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis colomai</i>	Lynch y Duellman, 1997	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis museosus</i>	Ibáñez, Jaramillo y Arosemena,	<i>ridens</i>

	1994	
<i>Pristimantis cruentus</i>	Peters, 1873	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis moro</i>	Savage, 1965	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis pirrensis</i>	Ibáñez y Crawford, 2004	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis altae</i>	Dunn, 1942	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis pardalis</i>	Barbour, 1928	<i>ridens</i>
<i>Pristimantis w-nigrum</i>	Boettger, 1892	<i>rubicundus</i>
<i>pristimantis lanthanites</i>	Lynch, 1975	<i>rubicundus</i>
<i>Pristimantis shrevei</i>	Schwartz, 1967	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis euphronides</i>	Schwartz, 1967	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis affinis</i>	Werner, 1899	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis nervicus</i>	Lynch, 1994	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis urichi</i>	Boettger, 1894	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis rozei</i>	Rivero, 1961	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimanris caryophyllaceus</i>	Barbour, 1928	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis erythropleura</i>	Boulenger, 1896	<i>unistrigatus</i>
<i>Pristimantis aff altamazonicus</i>	Barbour y Dunn, 1921	<i>unistrigatus</i>
<i>Oreobates cruralis</i>	Boulenger, 1902	

Tabla 2. Número de museo, especie, coordenadas, números de acceso del GenBank y secuencias adicionales incluidas en este estudio. Abreviaciones: QCAZ, Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Ecuador); MNCN, Museo Nacional de Ciencias Naturales (España); MNK-A, Colección de Anfibios, Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado (Bolivia); MHNC, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (Perú); CORBIDI, Colección del Centro de Ornitología y Biodiversidad (Perú); CBG, Colección del Centro de Biodiversidad y Genética (Bolivia); KU, University of Kansas Natural History Museum (Estados Unidos de Norte América); MVUP, Museo de Vertebrados de la Universidad de Panamá (Panamá); MZUSP, Museo de Zoología, Universidad de São Paulo (Brasil). Abreviaciones de series de campo: CCF, Claudia Cortez (Bolivia); AMS; Arturo Muñoz Sanabria (Museo de Historia natural Alcide d’Orvigni- Bolivia); OQM, Oliver Quinteros Muñoz (Museo de Historia natural Alcide d’Orvigni-Bolivia); BO, Serie de campo Centro de Biodiversidad y Genética (Bolivia) AJC, Andrew Crawford; KRC, Karen Lips; NPRS, Nelsi Pinto.

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
CORBIDI 8142	<i>P. sp.</i>	Perú	No disponible				pendiente		pendiente	Este estudio
CORBIDI 8926	<i>P.ps</i>	Perú	No disponible				pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 15920	<i>P. achatinus</i>		Santo Domingo de los Tsáchilas,	-0.32	-78.99		pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Alluriquín							Este estudio
QCAZ 19935	<i>P. achatinus</i>		Pichincha: 4 km NW La Florida,	-0.25	-79.03	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Finca Gloria							Este estudio
QCAZ 23588	<i>P. achatinus</i>		Guayas: 5 Km Este de Naranjal en la	-2.69	-79.60	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	carretera a Bucay							Este estudio
QCAZ 37037	<i>P. achatinus</i>	Ecuador	La Unión del Toachi, Otongachi	-0.33	-78.95	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
QCAZ 39964	<i>P. achatinus</i>	Ecuador				pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 40290	<i>P. achatinus</i>		Alto Tambo, A4 km al oeste de Alto Tambo por la línea del tren que va a	0.91	-78.58	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	el progreso							Este estudio
QCAZ 40393	<i>P. achatinus</i>		Cotopaxi, cantón Sigchos, a 18,2 km de Quillotuña, vía Sigchos-Pucayacu, S00°39,805´,	-0.68	-79.02	pendiente	pendiente	pendiente		
		Ecuador	W078°59,756´, 1420 m							Este estudio
QCAZ 40442	<i>P. achatinus</i>		Cotopaxi, cantón Sigchos, a 13,6 km de Quillotuña, vía Sigchos-Pucayacu	-0.67	-79.01	pendiente		pendiente	pendiente	
		Ecuador								Este estudio
QCAZ 47004	<i>P. achatinus</i>		Azuay, Cuenca, Molleturo,	-2.69	-79.42	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Comunidad Luz María, 1909							Este estudio
QCAZ 50436	<i>P. achatinus</i>		Pichincha, La Unión del Toachi, Centro de Interpretación Ambiental				pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Otongachi							Este estudio
AJC 0573	<i>P. achatinus</i>		Darien, Cana main camp, Sendero	7.81	-77.73	JN991485	JN991420	JN991349	JQ025168	Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
		Panamá	Boca de Cupe							
KU 217809	<i>P. achatinus</i>		Manabi, Rio Cuaque E	0.06	-80.05	EF493827	KU217809			
		Ecuador	Pedernales, Pedernales							Heinicke <i>et al.</i> , 2007
KU 291627	<i>P. aniptopalmitatus</i>		Pasco, 2.9 km N, 5.5 km E	-10.45	-75.15	EF493390				
		Perú	Oxapampa							Heinicke <i>et al.</i> , 2007
CORBIDI 0638	<i>P. avicuporum</i>		Camino La Cueva (Rio Lejia)-			pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Perú	Añasco Pueblo							Este estudio
CORBIDI 8910	<i>P. bipunctatus</i>	Perú	Pasco Oxapampa Chacos	-10.52	-75.45	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 8911	<i>P. bipunctatus</i>	Perú	Pasco Oxapampa Chacos	-10.52	-75.45	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
KU 291638	<i>P. caprifer</i>	Ecuador	Ecuador: Pichincha, La Palma	-0.32	-78.92	EF493391				Heinicke <i>et al.</i> , 2007
CH 6367	<i>P. caryophyllaceus</i>	Panamá	Panamá Darién Cana, Laguna	7.93	-77.72	JN991501	JN991436	JN991365	JQ025175	Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
MNRJ 35338	<i>P. cf paulodutra</i>	Brasil	Itacare, BA	-14.28	-3.90	JX267296			JX267571	Canedo y Haddad, 2012
MZUSP 139440	<i>P. cf. fenestratus</i>	Brasil	Tapirape, Maraba, PA	-6.21	-52.70	JX267392	JX267540		JX267678	Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 49744	<i>P. cf. ramagii</i>	Brasil	Indiaroba, SE	-11.48	-37.53	JX267300			JX267577	Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 49745	<i>P. cf. ramagii</i>	Brasil	Indiaroba, SE	-11.48	-37.53	JX267400	JX267484		JX267575	Canedo y Haddad, 2012
MTD45073	<i>P. cf. Rhabdolaemus</i>	Perú	Pasco, Aquimarca	-10.45	-75.15	EU186660				Hedges <i>et al.</i> , 2008
MUSM 26791	<i>P. cf. Toftae</i>	Perú	Huánuco Panguana	-9.61	-74.94	JN991503	JN991439			Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
MNRJ 53762	<i>P. cf. vinhai</i>	Brasil	Itubera, BA	-13.73	-39.15	JX267409	JX267353		JX267590	Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 53765	<i>P. cf. vinhai</i>	Brasil	Itubera, BA	-13.73	-39.15	JX267411	JX267491		JX267592	Canedo y Haddad, 2012
MTR 13417	<i>P. cf. vinhai</i>	Brasil	Trancoso, BA	-16.58	-39.09	JX267362			JX267587	Canedo y Haddad, 2012
MTR 13631	<i>P. cf. vinhai</i>	Brasil	Camacan, BA	-15.41	-39.50	JX267410	JX267365		JX267591	Canedo y Haddad, 2012
101MC	<i>P. chiastonotus</i>	Guayana Francesa	Tibourou	4.47	-52.33	JN690687	JN691301			Fouquet <i>et al.</i> , 2012

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
162AF	<i>P. chiastonotus</i>	Surinam	Brownsberg	4.88	-55.22	JN690700	EU201061			Fouquet <i>et al.</i> , 2012
KU212278	<i>P. citriogaster</i>		San Martin, San Martin, Cataratas	-6.36	-77.12	EF493700				
		Perú	Ahnashiyacu, 14 km NE Tarapoto							Heinicke <i>et al.</i> , 2007
QCAZ 41869	<i>P. condor</i>		Gral Leonidas Plaza Gutiérrez (Limón), En el Río Napinaza, río	-2.92	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	abajo							Este estudio
QCAZ 48642	<i>P. condor</i>		Comunidad Shuar El Tink, Reserva	-3.30	-78.45	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Suritiak							Este estudio
KU217857	<i>P. condor</i>		Morona-Santaigo, 4.6 km N	-3.36	-7.86	EF493701	EF493443			
		Ecuador	Gualaquiza							Heinicke <i>et al.</i> , 2007
QCAZ 17013	<i>P. conspicillatus</i>		Morona Santiago: Tiink, Río	-3.33	-78.45	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Zamora.							Este estudio
QCAZ 17023	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Morona Santiago: Limón Indanza	-2.97	-78.42	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 18007	<i>P. conspicillatus</i>		Napo: Estación Biológica Jatun	-1.06	-77.61	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Sacha							Este estudio
QCAZ 19217	<i>P. conspicillatus</i>		Orellana: Estación Científica Yasuní	-0.68	-76.40	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	PUCE.							Este estudio
QCAZ 20685	<i>P. conspicillatus</i>		Orellana: Estación Científica Yasuní	-0.68	-76.40	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	PUCE Km 7 1/2 Poza 1							Este estudio
QCAZ 27834	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Sucumbíos: Zábalo. Familia Criollo	-0.32	-75.77	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
QCAZ 28054	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Sucumbíos: Zábalo. Familia Criollo	-0.32	-75.77	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
QCAZ 28437	<i>P. conspicillatus</i>		Sucumbíos: Monte Tour. Puente del	-0.03	-76.32	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Río Cuyabeno							Este estudio
QCAZ 28444	<i>P. conspicillatus</i>		Sucumbíos: Monte Tour. Puente del	-0.03	-76.32	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Río Cuyabeno							Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
QCAZ 31058	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Zamora Chinchipe: Destacamento Militar Shaime	-4.33	-78.66	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 31631	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Napo: Cascada de San Rafael	-0.10	-77.58		pendiente		pendiente	Este estudio
QCAZ 32840	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Morona Santiago: Gral. Leonidas Plaza Gutiérrez	-2.92	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 38880	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Alrededores de Villano, Comunidad Paparawua, Paparawua Unidad 3	-1.48	-77.44	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 38991	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Alrededores de Villano, Comunidad Kurintza, Kurintza Unidad 3	-1.51	-77.51	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 39001	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Alrededores de Villano, Comunidad Kurintza, Kurintza Unidad 3	-1.51	-77.51	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 39263	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Alrededores de Villano, campamento petrolero de AGIP, K10 Unidad 1	-1.48	-77.53	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 39415	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Pastaza: Cononaco, Bataburo Lodge, al sur de la carretera desde Cononaco	-1.21	-76.72		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 39468	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Orellana: Nuevo Rocafuerte, Alta Florencia	-0.90	-75.44	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 39596	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Pastaza: Finca km 6 vía San Ramón-El Triunfo, Cooperativa Mariscal Sucre, Centro Ecológico Sancha	-1.37	-77.86	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
QCAZ 40793	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Arajuno, Río Pucayacu, Zamora Chinchipe, Piuntza, Ranario de Don Mesías San Martín	-3.86	-78.86	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
QCAZ 41016	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Parque Nacional Yasuní, Estación Científica Yasuní PUCE, recorrido entre la estación y la segunda laguna (sendero laguna)	-0.67	-76.40	pendiente	pendiente	pendiente		Este estudio
QCAZ 41833	<i>P. conspicillatus</i>		General Leonidas Plaza Gutiérrez (Limón), a 6,6 km al norte del parque central de General Leonidas	-2.93	-78.41	pendiente	pendiente		pendiente	
QCAZ 41840	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Plaza Gutiérrez (Río Napinaza)							Este estudio
			General Leonidas Plaza Gutiérrez (Limón), a 6,6 km al norte del parque central de General Leonidas	-2.93	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
QCAZ 41861	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Plaza Gutiérrez (Río Napinaza)							Este estudio
			Gral Leonidas Plaza Gutiérrez (Limón), En el Río Napinaza, río abajo	-2.92	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
QCAZ 41868	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	General Leonidas Plaza Gutiérrez (Limón), a 6,6 km al norte del parque central de General Leonidas	-2.93	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 41963	<i>P. conspicillatus</i>		Plaza Gutiérrez (Río Napinaza)							
QCAZ 43996	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Gral Leonidas Plaza Gutiérrez (Limón), Río Napinaza	-2.92	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
			Prov. Orellana, Río Napo, Áñangu,	-0.52	-76.38	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
QCAZ 48494	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Banco sur							Este estudio
			Orellana, Cantón Loreto Reserva Río Bigal, altitud 930	-0.52	-77.42	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
QCAZ 48542	<i>P. conspicillatus</i>		Morana Santiago, 6.6 km al norte de Limón desde el Parque Central Vía a	-2.93	-78.41	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Macas							Este estudio
QCAZ 51916	<i>P. conspicillatus</i>		Tunguragua, Río Verde, en los alrededores del pueblo y a lo largo de sendero de 2 km rumbo a un río	-1.40	-78.30	pendiente	pendiente		pendiente	
		Ecuador	afuente del Río Verde							Este estudio
QCAZ 52511	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Tunguragua, Reserva Río Zuñac	-1.38	-78.16	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
QCAZ 52554	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Morana Santiago, Rancho Fátima	-2.26	-78.14	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 53094	<i>P. conspicillatus</i>	Ecuador	Pastaza, Comunidad Puka Yaku				pendiente			Este estudio
QCAZ28448	<i>P. conspicillatus</i>		Sucumbíos: Monte Tour. Puente del	-0.03	-76.32		EF493529		EF493437	
		Ecuador	Río Cuyabeno							Hedges <i>et al.</i> , 2008
CBG 1154	<i>P. danae</i>		Territorio Indígena, Parque Nacional Isiboro Secure (Tipnis) San	-14.35	-67.40		pendiente		pendiente	
		Bolivia	Miguelito							Este estudio
CBG 614	<i>P. danae</i>		Territorio Indígena, Parque Nacional Isiboro Secure (Tipnis) Santo	-16.75	-65.71	pendiente	pendiente		pendiente	
		Bolivia	Domingo							Este estudio
AMS 1148	<i>P. danae</i>	Bolivia	Mosetenez	-16.67	-66.48	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
IDLR 4001	<i>P. danae</i>		La Paz: Santa Cruz de Valle Ameno	-14.67	-68.58		EU192260			Padial y De la Riva, 2009
		Bolivia								
IDLR 4815	<i>P. danae</i>		Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.04	-71.47		EU192266			Padial y De la Riva, 2009
		Perú								
IDLR 4822	<i>P. danae</i>		Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.04	-71.47		EU192269			Padial y De la Riva, 2009
		Perú								

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
IDLR 4824	<i>P. danae</i>	Perú	Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.04	-71.47		EU192271			Padial y De la Riva, 2009
DLR 4825	<i>P. danae</i>	Perú	Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.04	-71.47		EU192272			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 43062	<i>P. danae</i>	Bolivia	La Paz: Huairuro, senda San José – Apolo	-14.19	-68.33		EU192261-2			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 43069	<i>P. danae</i>	Bolivia	La Paz: Huairuro, senda San José – Apolo	-14.19	-68.33		EU192263-4			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 44232	<i>P. danae</i>	Perú	Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.07	-71.18		EU192267			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 44234	<i>P. danae</i>	Perú	Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.07	-71.18		EU192270			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 44234	<i>P. danae</i>	Perú	Cusco: Unión, Valle de Kosñipata	-13.07	-71.18		EU192270			Padial y De la Riva, 2009
MNKA 7182	<i>P. danae</i>	Bolivia	La Paz: Huairuro, senda San José – Apolo	-17.55	-65.34		EU192261-2			Padial y De la Riva, 2009
MNKA 7190	<i>P. danae</i>	Bolivia	La Paz: Huairuro, senda San José – Apolo	-17.55	-65.34		EU192263-4			Padial y De la Riva, 2009
MNKA 7273	<i>P. danae</i>	Bolivia	La Paz: Serranía Bella Vista	-15.68	-67.47		EU192265			Padial y De la Riva, 2009
CBG 1166	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	Territorio Indígena, Parque Nacional Isiboro Secure (Tipnis) San andita	-16.75	-65.71		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CBG 1832	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	Territorio Indígena, Parque Nacional Isiboro Secure (Tipnis) Villa fatima	-14.35	-67.40		pendiente			Este estudio
CBG 609	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	Territorio Indígena, Parque Nacional	-16.75	-65.71		pendiente			Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
			Isiboro Secure (Tipnis) Santo Domingo							
CBG 685	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	La Paz, Suapi	-16.11	-67.77	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
CCF 15	<i>P. fenestratus</i>		Provincia Abel Iturralde-Localidad	-14.35	-67.40	pendiente	pendiente		pendiente	
		Bolivia	San Miguel del Bala (de media hora a 45 minutos subiendo el Río Beni							Este estudio
CCF 34	<i>P. fenestratus</i>		Provincia Abel Iturralde-Localidad	-14.35	-67.40		pendiente		pendiente	
		Bolivia	San Miguel del Bala (de media hora a 45 minutos subiendo el Río Beni							Este estudio
CCF 39	<i>P. fenestratus</i>		Provincia Abel Iturralde-Localidad	-14.35	-67.40	pendiente	pendiente		pendiente	
		Bolivia	San Miguel del Bala (de media hora a 45 minutos subiendo el Río Beni							Este estudio
CCF 9	<i>P. fenestratus</i>		Provincia Abel Iturralde-Localidad	-14.35	-67.40	pendiente	pendiente		pendiente	
		Bolivia	San Miguel del Bala (de media hora a 45 minutos subiendo el Río Beni							Este estudio
AMS 1142	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	rio altamacho ipiri	-16.05	-66.67		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
AMS 1149	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	Mosetenez	-16.67	-66.48	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
MHNSM 9298	<i>P. fenestratus</i>			no			EF493703			
		Perú		disponible						Heinicke <i>et al.</i> , 2007
MNCN 43031	<i>P. fenestratus</i>		Cochabamba: Los Guácharos	-17.06	-65.48		EU192276			Padial y De la Riva, 2009
		Bolivia								
MNCN 4109	<i>P. fenestratus</i>	Bolivia	Cochabamba: Los Guácharos	-17.06	-65.48		EU192276			Padial <i>et al.</i> , 2009
MNCN-DNA 544	<i>P. fenestratus</i>		La Paz, Carretera Charazani-Apolo,				EU712632			
		Bolivia	Yungas entre rio necos y rio Yuyo							Padial <i>et al.</i> , 2009

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
MHMC 4919	<i>P. fenestratus</i>	Perú	Cusco, Cocha Camungo	-12.43	-70.67		EU712633			Padial <i>et al.</i> , 2009
MNKA 66292	<i>P. fenestratus</i>		La Paz: Chalalán	-14.19	-68.33					Padial y De la Riva, 2009
		Bolivia								
MNKA 6629	<i>P. fenestratus</i>		La Paz: Chalalán EU192273	-14.19	-68.33					Padial y De la Riva, 2009
		Bolivia								
MNKA 6630	<i>P. fenestratus</i>		La Paz: Sadiri, Arroyo Yariapo	-12.39	-68.59		EU192274			Padial y De la Riva, 2009
		Bolivia								
MNKA 6631	<i>P. fenestratus</i>		Cochabamba: Los Guácharos	-17.06	-65.48		EU192275			Padial y De la Riva, 2009
		Bolivia								
AJC 1339	<i>P. gaigei</i>		Antioquia Maceo	6.55	-74.78	JN991511	JN991447	JN991376		Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
		Colombia								
AJC 1360	<i>P. gaigei</i>		Tolima Ruinas Falán	9.13	-82.50	JN991512	JN991448	JN991377	JQ025184	Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
		Colombia								
CH 6471	<i>P. gaigei</i>		PaBocas del Toro Río Changuinola	9.13	82.50	JN991512	JN991448	JN991377	JQ025184	Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
		Panamá								
KRL 0825	<i>P. gaigei</i>		Cocle	8.67	80.59	FJ438809	FJ438798			Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
		Panamá								
KRL 0864	<i>P. gaigei</i>		Cocle	8.67	80.59		FJ784412	FJ766791		Crawford <i>et al.</i> , 2010
		Panamá								
KRL 1079	<i>P. gaigei</i>		Panamá	8.67	80.59		FJ784461	FJ784461		Crawford <i>et al.</i> , 2010
		Panamá								
KRL 1196	<i>P. gaigei</i>		Cocle	8.67	80.59		FJ784487	FJ766789		Crawford <i>et al.</i> , 2010
		Panamá								
KRL 1202	<i>P. gaigei</i>		Cocle	8.67	80.59		FJ784490	FJ766788		Crawford <i>et al.</i> , 2010
		Panamá								
KRL 8880	<i>P. gaigei</i>		Cocle, Parque Nacional Omar	8.67	80.59	JN991514	JN991450		JQ025185	
		Panamá	Torrijos H., El Cope							Crawford <i>et al.</i> , 2010

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
MVUP 1910	<i>P. gaigei</i>	Panamá	Cocle	8.68	80.60		FJ784490	FJ766790		Crawford <i>et al.</i> , 2010
NPORS 0009	<i>P. gaigei</i>	Colombia	Antioquia, Amalfi, La Guayana	6.82	75.15	JN991513	JN991449	JN991378	JQ025186	Pinto-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
USNM 572380	<i>P. gaigei</i>	Panamá	Cocle	8.67	80.59			FJ766792		Crawford <i>et al.</i> , 2010
USNM 572381	<i>P. gaigei</i>	Panamá	Cocle	8.67	80.59			FJ766789		Crawford <i>et al.</i> , 2010
USNM 572382	<i>P. gaigei</i>	Panamá	Cocle	8.67	80.59			FJ766789		Crawford <i>et al.</i> , 2010
USNM 572383	<i>P. gaigei</i>	Panamá	Cocle	8.67	80.59			FJ766788		Crawford <i>et al.</i> , 2010
MNCN 42983	<i>P. Koehleri</i>	Bolivia	Santa Cruz, La Chonta	-17.65	-63.70	FJ438810	FJ438799/EU192280			Padial <i>et al.</i> , 2009
MNCN 42986	<i>P. Koehleri</i>	Bolivia	Bolivia: Santa Cruz: La Chonta	-17.65	-63.70		EU192281			Padial <i>et al.</i> , 2009
MNCN 42990	<i>P. Koehleri</i>	Bolivia	Santa Cruz: Km 6 Angostura-Samaipata road	-18.18	-63.57		EU192278			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 43013	<i>P. Koehleri</i>	Bolivia	Santa Cruz: La Chonta	-17.65	-63.70		EU192282			Padial y De la Riva, 2009
MNKA 6627	<i>P. Koehleri</i>	Bolivia	Santa Cruz: Km 6 Angostura-Samaipata	-18.18	-63.56		EU192279			Padial y De la Riva, 2009
CORBIDI 1952	<i>P. lymani</i>	Perú	No disponible			pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 3684	<i>P. lymani</i>	Perú	Tumbes, El Caucho	-3.81	-80.27	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 4283	<i>P. lymani</i>	Perú	Lambayeque El Totoral-Quebrada Palacios (Distrito de Salas)	-5.94	-79.56	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 4409	<i>P. lymani</i>	Perú	Tumbes, Quebrada faical	-3.82	-80.26		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 4572	<i>P. lymani</i>	Perú	Tumbes Quebrada faical	-3.82	-80.26	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 5746	<i>P. lymani</i>	Perú	Cajamarca Jaén Bellavista	-2.89	-73.02	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 5753	<i>P. lymani</i>	Perú	Cajamarca Cutervo Puerto Malleta	-2.35	-75.82	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
CORBIDI 5758	<i>P. lymani</i>	Perú	Amazonas, Cumba, Cumba	-7.04	-76.09	pendiente			pendiente	Este estudio
QCAZ 17760	<i>P. lymani</i>	Ecuador	Loja, valladolid	-4.55	-79.13	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
QCAZ 33228	<i>P. lymani</i>		Comuna Numbiaranga, Barrio	-4.21	-79.88	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Canguraka, Reserva Natural Lapiuna							Este estudio
QCAZ 35508	<i>P. lymani</i>		Zamora Chinchipe: Vía Palanda-	-4.69	-79.13	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Zumba. A 89 km de Vilcabamba							Este estudio
QCAZ 46311	<i>P. lymani</i>		Loja, Zamora-Huaico, Vertiente San	-4.10	-79.17	pendiente	pendiente	pendiente		
		Ecuador	Simón							Este estudio
QCAZ 47399	<i>P. lymani</i>		Loja, Cantón: Celica, Ciudad de	-4.10	-79.98	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Celica a 2 km vía Almor							Este estudio
QCAZ 47402	<i>P. lymani</i>		Loja, Cantón: Celica, Ciudad de	-4.10	-79.98	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Celica a 2 km vía Almor							Este estudio
QCAZ 47428	<i>P. lymani</i>		Loja, Cantón: Puyango, Parroquia:	-3.99	-80.02	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
			Alamor, Camino de herradura que							
			sube desde Alamor, loma arriba 800							
		Ecuador	m, altitud 1550							Este estudio
QCAZ 47488	<i>P. lymani</i>		Loja, Cantón: Celica, Ciudad de	-4.10	-79.98	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Celica a 2 km vía Almor							Este estudio
QCAZ 47490	<i>P. lymani</i>		Loja, Cantón: Puyango, Parroquia:	-3.99	-80.02	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
			Alamor, Camino de herradura que							
			sube desde Alamor, loma arriba 800							
		Ecuador	m							Este estudio
KU218019	<i>P. lymani</i>	Ecuador	Loja, 3.9 km E Loja	-3.99	-79.20	EF493392				Hedges <i>et al.</i> , 2008
CORBIDI 4724	<i>P. malkini</i>	Perú	Loreto Andoas	-2.35	-75.82	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 4778	<i>P. malkini</i>	Perú	Loreto, Andoas, Rio Corrientes	-3.07	-75.83	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
CORBIDI 5303	<i>P. malkini</i>	Perú	Loreto	-2.35	-75.82	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 5863	<i>P. malkini</i>		Loreto El Chino (Rio Yanayacu-	-3.14	-77.30	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Perú	Cuenca del Napo)							Este estudio
QCAZ 25444	<i>P. malkini</i>		Napo: Estación Biológica Jatun	-1.08	-77.61	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Sacha							Este estudio
QCAZ 28294	<i>P. malkini</i>		Monte Tour Puente del Río	-0.03	-76.32	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Cuyabeno							Este estudio
QCAZ 28296	<i>P. malkini</i>		Monte Tour Puente del Río	-0.03	-76.32	pendiente	pendiente			
		Ecuador	Cuyabeno							Este estudio
QCAZ 35904	<i>P. malkini</i>		Orellana: Parque Nacional Yasuní,	-0.69	-76.43		pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	NPF, campamento							Este estudio
QCAZ 35909	<i>P. malkini</i>		Orellana: Parque Nacional Yasuní,	-0.81	-76.40	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Km 66, saladero							Este estudio
MNRJ 40299	<i>P. paulodutra</i>		Canavieiras, BA	-15.68	-38.95	JX267360			JX267573	Canedo,C. yHaddad,C.F 2012.
		Brasil								
MNRJ 46880	<i>P. paulodutra</i>		Boa Nova, BA	-14.35	-40.21	JX267297			JX267572	Canedo,C. yHaddad,C.F 2012.
		Brasil								
CORBIDI 4710	<i>P. Peruvianus</i>	Perú	Loreto, Andoas	-2.35	-75.82	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 5893	<i>P. Peruvianus</i>		Loreto, Curupa (Rio Yanayacu-	-2.89	-73.02	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Perú	Cuenca del Napo)							Este estudio
CORBIDI 6394	<i>P. Peruvianus</i>		San Martin Picota Area de	-3.14	-77.30	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Perú	Conservacion Municipal Chambira							Este estudio
CORBIDI 6788	<i>P. Peruvianus</i>		San Martín, Tarapoto, Carretera	-2.35	-75.82	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Perú	Yurimaguas							Este estudio
CORBIDI 7475	<i>P. Peruvianus</i>	Perú	Loreto Datem Sector 3	-12.80	-73.42		pendiente		pendiente	Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
CORBIDI 7484	<i>P. Peruvianus</i>	Perú	Loreto Datem Sector 3	-12.96	-73.62		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 16754	<i>P. Peruvianus</i>		Estación Científica Yasuní PUCE.	-0.68	-76.40		pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Sendero Botánico							Este estudio
QCAZ 25494	<i>P. Peruvianus</i>	Ecuador	Pastaza: Kapawi Lodge.	-2.54	-76.86	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 25512	<i>P. Peruvianus</i>	Ecuador	Pastaza: Kapawi Lodge.	-2.54	-76.86	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 28331	<i>P. Peruvianus</i>	Ecuador	Sucumbíos: Puerto Bolívar	-0.09	-76.14	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
QCAZ 39420	<i>P. Peruvianus</i>		Pastaza: Cononaco, Bataburo Lodge,	-1.21	-76.72	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	al sur de la carretera desde Cononaco							Este estudio
QCAZ 39470	<i>P. Peruvianus</i>		Orellana: Nuevo Rocafuerte, Alta	-0.90	-75.44	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Florencia							Este estudio
QCAZ 41487	<i>P. Peruvianus</i>		Provincia: Zamora Chinchipe,	-4.23	-78.66	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
			Cantón: Nangaritz, Parroquia:							
			Zurmi, Localidad: Las Orquídeas,							
		Ecuador	zona alterna alrededor del poblado							Este estudio
QCAZ 41517	<i>P. Peruvianus</i>		Zamora Chinchipe, Miazí Alto,	-4.26	-78.62	pendiente	pendiente	pendiente		
		Ecuador	Campamento "Tepuy"							Este estudio
QCAZ 41559	<i>P. Peruvianus</i>		Miazí Alto, Río que baja del	-4.25	-78.61	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	campamento							Este estudio
QCAZ 42424	<i>P. Peruvianus</i>		Ecuador, MoronaSantiago, Macas,	-2.10	-77.77	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	
		Ecuador	Macuma, Wisui							Este estudio
QCAZ 42474	<i>P. Peruvianus</i>		MoronaSantiago, Macas, Macuma,	-2.11	-77.76	pendiente		pendiente	pendiente	
		Ecuador	Wisui							Este estudio
QCAZ 46355	<i>P. Peruvianus</i>	Ecuador	Wisui, Morona Santiago, Ecuado	-2.11	-77.74	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
QCAZ 46379	<i>P. Peruvianus</i>		Morona Santiago, Cantón: Logroño,	-2.82	-78.00		pendiente		pendiente	
		Ecuador	Parroquia: Yaupi							Este estudio

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
QCAZ 46381	<i>P. Peruvianus</i>	Ecuador	Morona Santiago, Cantón: Logroño,	-2.82	-78.00		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
			Parroquia: Yaupi							
QCAZ 46413	<i>P. Peruvianus</i>	Ecuador	Morona Santiago, Cantón: Tiwintza,	-2.90	-77.89	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
			Parroquia: San José de Morona							
AJC 2025	<i>P. Peruvianus</i>	Perú	Perú: Huanuco, Puerto Inca,	-9.61	-74.94		JN991461	JN991392		Heinicke <i>et al.</i> , 2007
			Panguana, Rio Yuyapichis (AKA							
MHNSM9267	<i>P. Peruvianus</i>	Perú	Rio Lullapiches) near Rio Pachitea							Heinicke, M.P.,
			PN Manu	-12.01	-71.76		EF493707			Duellman, W.E. y
		Perú								Hedges, S.B.
AFlab 426	<i>P. ramagii</i>	Brasil	Igarassu, PE	-7.83	-34.91		JX267380			Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 36751	<i>P. ramagii</i>	Brasil	Pilar, AL	-9.59	-35.95		JX267318		JX267658	Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 46788	<i>P. ramagii</i>	Brasil	Itaporanga D'Ajuda, SE	-11.01	-37.31		JX267299		JX267576	Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 50249	<i>P. ramagii</i>	Brasil	Murici, AL	-11.01	-37.31		JX267319		JX267659	Canedo y Haddad, 2012
CORBIDI 5469	<i>P. reichlei</i>	Perú	Cusco, La Convencion, KP 59	-3.07	-75.83		pendiente		pendiente	Este estudio
CORBIDI 5741	<i>P. reichlei</i>	Perú	No disponible			pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
CORBIDI 6652	<i>P. reichlei</i>	Perú	No disponible			pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
IDLR 477	<i>P. reichlei</i>	Perú	Puno: Entre Puerto Leguia y San	-13.43	-70.37		EU192285			Padial y De la Riva, 2009
			Gabán							
MNCN 43012	<i>P. reichlei</i>	Bolivia	Cochabamba: Los Guácharos	-17.06	-65.48		EU192286			Padial y De la Riva, 2009

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
MNCN 43249	<i>P. reichlei</i>	Perú	Cusco: 5 km from San Lorenzo hacia Quince Mil	-11.01	-37.31		EU192288			Padial y De la Riva, 2009
MNCN DNA 9476	<i>P. reichlei</i>	Bolivia	Pando: Bioceanica	-6.89	-77.39		EU712719			Padial y De la Riva, 2009
MNCN DNA 9487	<i>P. reichlei</i>		Cusco: Pantiacolla	-13.52	-71.97		EU712720			Padial y De la Riva, 2009
MNKA 6621	<i>P. reichlei</i>	Bolivia	Cochabamba: Los Guácharos	-17.06	-65.48		EU192287			Padial y De la Riva, 2009
CORBIDI 6949	<i>P. rhabdolaemus</i>	Perú	Ayacucho La Mar Carretera Chiquintirca- San Antonio	-12.34	-72.87	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 8176	<i>P. rhabdolaemus</i>					pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 8204	<i>P. rhabdolaemus</i>	Perú	Cusco La Convención KP 158	-6.89	-77.39	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
KU173492	<i>P. rhabdolaemus</i>	Perú	Cuzco, Buenos Aires	-13.52	-71.97		EF493706			Padial y De la Riva, 2009
KU291651	<i>P. rhabdolaemus</i>	Perú	Pasco, 2.9 km N, 5.5 km E Oxapampa	-10.45	-75.15	EU186724	EU186706			Padial y De la Riva, 2009
MNCN DNA3940	<i>P. rhabdolaemus</i>	Bolivia	Santa Cruz, Serrano de la Siberia, between El Empalme yCarahuasi	-17.83	-64.75		EU192258			Padial y De la Riva, 2009
MNCN DNA4120	<i>P. rhabdolaemus</i>	Bolivia	Santa Cruz, La Yunga	-18.11	-63.96		EU192257			Padial y De la Riva, 2009
MNCN DNA 9494	<i>P. rhabdolaemus</i>	Perú	: Cusco, Cosnipata	-13.07	-71.18	FJ438813	FJ438802			Padial y De la Riva, 2009
AMS 1400	<i>P. samaipatae</i>	Bolivia	Santa Cruz, Refugio los volcanes	-18.17	-63.61	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
AMS 1410	<i>P. samaipatae</i>	Bolivia	Santa Cruz, Refugio los volcanes	-18.17	-63.61	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
MNCN 42987	<i>P. samaipatae</i>	Bolivia	Santa Cruz: Km 6 Angostura–	-18.18	-63.56		EU192292			Padial y De la Riva,

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
			Samaipata road							2009
MNCN 42988	<i>P. samaipatae</i>	Bolivia	Santa Cruz: Km 6 Angostura– Samaipata road	-18.18	-63.56		EU192290			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 42989	<i>P. samaipatae</i>	Bolivia	Santa Cruz: Km 6 Angostura– Samaipata road	-18.18	-63.56	FJ438814	EU192291			Padial y De la Riva, 2009
MNKA 6626	<i>P. samaipatae</i>	Bolivia	Santa Cruz: Km 6 Angostura– Samaipata road	-18.18	-63.56		EU192289			Padial y De la Riva, 2009
EF493393	<i>P. skydmainos</i>	Perú	Perú	-9.09	-75.16		EF493393			Hedges <i>et al.</i> , 2008
AMS 1595	<i>P. sp</i>	Bolivia	Pando Bai	-11.95	-68.65	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
BO 109	<i>P. sp</i>	Bolivia	Pando San José	-11.63	-66.55		pendiente		pendiente	Este estudio
OQM 123	<i>P. sp</i>	Bolivia	Valle del sacta	-17.12	-64.77	pendiente	pendiente		pendiente	Este estudio
CORBIDI 0685	<i>P. sp.</i>	Perú	San Martin, Mariscal Caceres, Laguna Negra	-6.89	-77.39	pendiente		pendiente	pendiente	Este estudio
CORBIDI 7426	<i>P. stictogaster</i>	Perú	Pasco, Oxapampa, Osoplaya	-12.34	-72.87				pendiente	Este estudio
CORBIDI 7427	<i>P. stictogaster</i>	Perú	Pasco, Oxapampa, Osoplaya	-12.34	-72.87	pendiente	pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
KU291659	<i>P. stictogaster</i>	Perú	Perú	-10.45	-7.15		EF493704		EF493445	Heinicke <i>et al.</i> , 2007
EU186650	<i>P. terraebolivaris</i>	Trinidad y Tobago	Tobago, ca King's Bay	10.50	-61.23		EU186650			Heinicke <i>et al.</i> , 2007
CORBIDI 5273	<i>P. toftae</i>	Perú	Madre de Dios, Tambopata, Baltimore	-5.94	-78.66		pendiente	pendiente	pendiente	Este estudio
KU215493	<i>P. toftae</i>	Perú	Madre de Dios, Cuzco Amazonico	-11.77	-70.81		EF493353			Hedges <i>et al.</i> , 2008
MNCN 43025	<i>P. toftae</i>	Bolivia	Cochabamba: Los Guacharos	-17.06	-65.48		EU192293			Padial y De la Riva, 2009
MNCN 43246	<i>P. toftae</i>	Bolivia	Cusco: San Pedro, Valle de				EU192294			Hedges <i>et al.</i> , 2008

Nº de Museo	Especie	País	Localidad	Lat.	Lon.	12S	16S	COI	RAG1	Fuente
AFlab 0445	<i>P. vinhai</i>	Bolivia	Marcapata							
			Una, BA	-15.16	-39.21	JX267412	JX267492		JX267593	Canedo y Haddad, 2012
AFlab 0923	<i>P. vinhai</i>	Brasil	Serra do Teimoso, BA	-15.15	-39.52	JX267343			JX267586	Canedo y Haddad, 2012
MNRJ 46479	<i>P. vinhai</i>	Brasil	Boa NOva, BA	-14.36	-40.21	JX267301			JX267585	Canedo y Haddad, 2012
MTR 13504	<i>P. vinhai</i>	Brasil	Trancoso, BA	-16.59	-39.10	JX267363			JX267588	Canedo y Haddad, 2012
MTR 13607	<i>P. vinhai</i>	Brasil	Camacan, BA	-15.41	-39.50	JX267408	JX267364		JX267589	Canedo y Haddad, 2012
ROM43978	<i>P. zeuctotylus</i>	Guyana	District 8, Mount Wokomung	5.08	-59.83	EU186678				Hedges <i>et al.</i> , 2008

Tabla 3. Cebadores utilizados en el presente estudio.

Gen	Cebador	Secuencia del Primer (5 -'3')	Dirección	FUENTE
COI	dgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAR	Reversa	Meyer <i>et al.</i> (2005)
COI	dgLCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGAYA	Derecha	Meyer <i>et al.</i> (2005)
COI	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Reversa	Folmer <i>et al</i> (1994)
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Derecha	Folmer <i>et al</i> (1994)
RAG1	R182	GCCATAACTGCTGGAGCATYAT	Derecha	Heinike <i>et al.</i> (2007)
RAG2	R270	AGYAGATGTTGCCTGGGTCTTC	Reversa	Heinike <i>et al.</i> (2007)
12S	MVZ50	TCTCGGTGTAAGCGAGAGGCTT	Reversa	Gaybeal <i>et al.</i> (1999)
12S	dgMVZ50	TYTCGGTGTAAGYGARAKGCTT	Reversa	Graybeal, 1997
12S	MVZ59	ATAGCACTGAAAAYGCTDAGATG	Derecha	Gaybeal <i>et al.</i> (1999)
12S	12Sh (12SZ-L)	AAAGGTTTGGTCCTAGCCTT	Derecha	Goebel, 1996
12S	12SK	TCCRGTA YRCTTACCDTGTTACGA	Reversa	Goebel, 1999
16S	12Sm	GGCAAGTCGTAACATGGTAAG	Derecha	Darst and Cannatella, 2004
16S	16Sa	ATGTTTTTGGTAAACAGGCG	Reversa	Palumbi <i>et al.</i> 1991
16S	16Sc	TATGGCCTAAAAGCTGCCAC	Derecha	Moriarty and Cannatella, 200
16S	16H47	AAAGRGCTTAGRTCTTTYGCA	Reversa	Heinike <i>et al.</i> (2007)
16S	16Sbr-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Reversa	Palumbi <i>et al.</i> (1991)

Tabla 4. Modelos de sustitución obtenidos para cada partición utilizada en los análisis filogenéticos. Las abreviaciones son: I = Proporción de sitios invariables, G = Parámetro de forma de la distribución gamma de la tasa de variación.

PARTICIÓN	MODELO	FRECUENCIA DE SUSTITUCIÓN								FRECUENCIA DE BASES			
		I	G	AC	AG	AT	CG	CT	GT	A	C	G	T
12S	GTR+I+G	0.231	0.764	3.641	8.957	3.897	0.660	18.498	1.000	0.375	0.231	0.147	0.247
tRNA-Val	K80+G	-	0.821	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16S	GTR+I+G	0.195	0.631	3.818	7.630	4.398	0.483	21.636	1.000	0.387	0.237	0.129	0.247
RAG1 (Primer codon)	HKY + I + G	0.450	0.943	-	-	-	-	-	-	0.354	0.186	0.253	0.208
RAG1 (Segundo codon)	SYM + I	0.123	-	0.795	4.090	1.002	0.734	5.197	1.000	-	-	-	-
RAG1 (Tercer codon)	HKY + I + G	0.007	1.553	-	-	-	-	-	-	0.382	0.259	0.126	0.233
COI (Primer codon)	SYM + G	-	0.813	0.576	4.878	0.509	0.155	9.518	1.000	-	-	-	-
COI (Segundo codon)	K80 + I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COI (Tercer codon)	HKY + I + G	0.007	1.553	-	-	-	-	-	-	0.382	0.259	0.126	0.233
Matriz Completa	GTR+I+G	0.432	0.424	4.659	8.646	4.558	0.436	22.754	1.000	0.384	0.230	0.131	0.255

Tabla 5. Variables acústicas de los cantos de anuncio utilizadas en el presente trabajo para *P. conspicillatus sensu lato*.

Parámetro	Descripción
Duración de la llamada	Tiempo desde el principio hasta el final de la llamada
Notas por llamado	Numero de notas que contiene cada canto
Frecuencia dominante del llamado	Frecuencia que contiene la mayor energía durante el canto
Frecuencia fundamental del llamado	Frecuencia que contiene la mayor energía en la primera armónica
Pulsos por nota	Numero de pulsos que contiene cada nota del canto
Tiempo de subida del llamado	Tiempo en el desde el principio del canto hasta el punto en el cual alcanza la mayor amplitud
Número de armónicas	Número de armónicas contenidas en cada llamado

Tabla 6. Estimación de los tiempos de divergencia evolutiva para el grupo de especies *P. conspicillatus* y *P. Perúvianus* en base a tiempos de calibración propuestos en la literatura: 57 Ma (Heinike *et al.*, 2007), 92.31 Ma (Wiens, 2007), 80 Ma (Wiens *et al.*, 2011), 70 Ma (Wiens, 2011), 50 Ma (Roelants *et al.*, 2007).

CLADO	Tiempo estimado en Ma				
	57	92.31	80	70	50
<i>P. Perúvianus-P. conspicillatus</i>	30.19	45.59	39.52	38.25	26.81
<i>Pristimantis Perúvianus</i>	18.48	31.19	18.49	23.38	16.56
<i>Pristimantis conspicillatus</i>	27.04	50.84	44.05	34.29	24.01
<i>Pristimantis euphronides</i>	23.39	39.46	34.17	29.67	20.78

Tabla 7. Medidas de Prioridades de Conservación, calculadas en el módulo de Tuatara del programa Mesquite en Base a la Distinción Evolutiva (ED) y la Distinción Evolutiva de los clados (EDc) para cada especie. Orden en base a las categorías de amenaza de la UICN de la última columna.

Especie	ED	EDc	UICN
<i>Pristimantis affinis</i>	0.3239	0.3033	VU
<i>Pristimantis condor</i>	0.2408	0.2812	VU
<i>Pristimantis koehleri</i>	0.2814	0.229	No evaluada
<i>Pristimantis reichlei</i>	0.5316	0.5144	No evaluada
<i>Pristimantis sagittulus</i>	0.3439	0.3556	No evaluada
<i>Pristimantis achatinus</i>	0.1401	0.118	LC
<i>Pristimantis caprifer</i>	0.7477	0.7761	LC
<i>Pristimantis chiastonotus</i>	0.4633	0.5146	LC
<i>Pristimantis consicillatus</i>	0.1274	0.0941	LC
<i>Pristimantis danae</i>	0.5775	0.6011	LC
<i>Pristimantis fenestratus</i>	0.1964	0.144	LC
<i>Pristimantis gaigei</i>	0.4945	0.5073	LC
<i>Pristimantis lymani</i>	0.5327	0.5106	LC
<i>Pristimantis malkini</i>	0.2457	0.2395	LC
<i>Pristimantis nervicus</i>	0.2649	0.2443	LC
<i>Pristimantis Perúvuanus</i>	0.3522	0.3662	LC
<i>Pristimantis ramagii</i>	0.5764	0.564	LC
<i>Pristimantis rhabdolaemus</i>	0.3208	0.2827	LC

<i>Pristimantis samaipatae</i>	0.315	0.3038	LC
<i>Pristimantis skydmainos</i>	0.4773	0.5007	LC
<i>Pristimantis terraebolivaris</i>	0.6123	0.637	LC
<i>Pristimantis euphronides</i>	0.4225	0.4248	EN
<i>Pristimantis shrevei</i>	0.427	0.4292	EN
<i>Pristimantis adiaastolus</i>	0.1244	0.1677	DD
<i>Pristimantis albertus</i>	0.3011	0.2778	DD
<i>Pristimantis aniptopalatus</i>	0.2034	0.2691	DD
<i>Pristimantis avicuporum</i>	0.5732	0.6144	DD
<i>Pristimantis bipunctatus</i>	0.3656	0.3285	DD
<i>Pristimantis citriogaster</i>	0.2081	0.202	DD
<i>Pristimantis stictogaster</i>	0.218	0.1947	DD
<i>Pristimantis</i> sp. (ECC1)	0.2287	0.2477	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECC2)	0.3175	0.3297	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECC3)	0.1687	0.1511	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECC4)	0.1826	0.1584	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 1)	0.3082	0.3511	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 10)	0.5546	0.5978	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 13)	0.3063	0.2692	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 14)	0.2752	0.2887	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 15)	0.2678	0.2814	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 16)	0.1733	0.1904	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 17)	0.1433	0.1334	-
<i>Pristimantis</i> sp. (ECNC 18)	0.1833	0.1904	-

<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 19)	0.1964	0.144	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 2)	0.4047	0.3947	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 20)	0.1917	0.2336	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 21)	0.135	0.101	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 22)	0.1733	0.1504	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 3)	0.3723	0.3202	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 3)	0.1927	0.175	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 4)	0.2934	0.3829	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 5)	0.6264	0.6537	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 6)	0.8518	0.8765	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 7)	0.5343	0.5678	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 8)	0.6028	0.5904	-
<i>Pristimantis sp.</i> (ECNC 9)	0.5776	0.6208	-

Tabla 7. Continuación.

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo Tiocinato-Guanidina utilizado para la extracción de ADN con modificaciones realizadas en el laboratorio de biología molecular de la división de Herpetología del QCAZ

Lisis Celular

1. Calentar la solución de lisis a 55°C hasta que el precipitado vuelva a estar en solución.
2. Colocar 10 mg de tejido macerado en un tubo de 1.5ml que contenga 300µl de la solución de lisis de células.
3. Añadir 3-5µl e proteinasa K (20mg/ml), dar un vórtex rápido e incubar de 3-6 horas (dejarlo durante toda la noche si fuera necesario) a 55°C hasta que el tejido se haya digerido.
4. Durante el proceso de lisis, las muestras deben ser agitadas por lo menos cada 30 minutos.
5. Dar un vórtex suave para homogenizar.
6. Enfriar las muestras a temperatura ambiente.

Precipitación proteica

1. Añadir 100µl de Solución de precipitación de proteínas en cada tubo con células lisadas y dar un vórtex de 10-20 segundos para mezclar el contenido.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
3. Trasladar el sobrenadante, que contiene ADN a un tubo nuevo de 1.5ml previamente rotulado. El pellet formado en el fondo del tubo contiene proteínas y es descartado.

Precipitación de ADN

1. Añadir 300µl de Isopropanol frío (-20°C) y mezclarlo invirtiendo el tubo varias veces.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el pellet, que en este caso contiene el ADN.
4. Añadir 300µl de etanol 70% e invertir varias veces el tubo para lavar el pellet de ADN.
5. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
6. Descartar una vez más el sobrenadante.
7. Para evitar los residuos de etanol en el tubo, dejarlo con la tapa abierta durante una hora aproximadamente de manera que se evapore, teniendo cuidado de que el pellet no se deshidrate demasiado.

Hidratación de ADN y almacenamiento

1. Añadir 50µl de 10mM TrisCl, pH 8.0, Resuspender el ADN dando golpes suaves a la base del tubo.
2. Almacenar hasta el día siguiente a -20°C

Anexo 2. Protocolos de PCR. la temperatura es en grados centígrados y el tiempo se encuentra en segundos.

GEN	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
12S; 16S	1	94	02:00
		42	00:30
		72	01:00
	5	94	00:30
		42	00:30
		72	01:00
	22	94	00:30
		50	00:30
		72	01:00
	1	4	∞

GEN	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
COI	1	94	02:00
		50	00:30
		72	01:00
	10	94	00:30
		42	00:30
		72	01:00
	29	94	00:30
		57	00:30
		72	01:00
	1	72	5
	1	4	∞

GEN	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
RAG1	1	94	05:00
	32	94	00:30
		60	00:30
		72	00:30
	1	72	07:00
	1	4	∞

Anexo 3. Descripción de *Pristimantis conspicillatus* traducido de Günther, 1858.

Hyloides conspicillatus

De la mitad del tamaño que *Rana esculenta*. Hocico más bien alargado y puntiagudo. Dientes vomerinos en dos series muy oblicuas cada una comienza en el borde inferior de la nariz llegando detrás de ellos; lengua con una muy pequeña muesca por detrás; tímpano de la mitad del tamaño del ojo. Discos bastante conspicuos. Por encima de color marrón, región loreal de color marrón oscuro; con una barra negrusca entre los ojos, otra oblicua desde el ojo y por encima del tímpano y la tercera por debajo del ojo; dorso marmolado oscuro; extremidades con algunas bandas cruzadas de color negrusco; parte posterior de las piernas de color negro, marmolado con blanco; vientre de color grisáceo blanco, marmolado con marrón negrusco.

a. Hembra adulta. No en buen estado. Andes de Ecuador. De la colección de Mr. Fraser.

Largo del cuerpo $1 \frac{2}{3}$ '' (4,23 cm); largo de la extremidad anterior $1 \frac{1}{6}$ '' (2,96 cm); largo de la extremidad posterior 3''(7,62 cm) ; largo del 4to dedo del pie $\frac{5}{6}$ '' (2,1167). Los huevos son bastante grandes, la mitad del tamaño de un guisante, y hay solo 16 en una mitad del ovario.

Anexo 4. Expedición de Luis Fraser en Ecuador.

Louis Fraser fue un historiador natural, enviado a Ecuador durante 1857–1859 por Philip Luter Sclater de la Sociedad Zoológica de Londres, con el principal objetivo de hacer colectas ornitológicas y de mamíferos, sin embargo durante el tiempo que permaneció en el país también hizo colectas de reptiles, anfibios, insectos, etc.

Fraser arribó al puerto de Guayaquil el 20 de septiembre de 1857 pero el primer lugar de colecta fue Cuenca, donde permaneció a partir del 6 de octubre hasta noviembre de 1857 y regresó en marzo hasta mayo de 1858. Los meses de diciembre, enero y febrero colectó en Gualaquiza y Zamora. Durante junio de 1858 se dirige al norte del país a su encuentro con Edward Cope en Quito, ese mismo mes realiza colectas en Riobamba, luego continúa sus expediciones en Chillanes y Pallatanga (el cual era su lugar base y es donde regresaba constantemente hasta mediados de diciembre de 1858), durante este tiempo también realizó colectas en las localidades de Matos Pinipi y Titiacun. En 1859 Fraser hace colectas en Riobamba y Panza así también organiza expediciones a Lloa, Guápulo, Guagua y Rucu Pichincha. Entre julio y septiembre permanece en Babahoyo por el río Guayaquil. A principios de octubre se dirige a Esmeraldas donde realiza sus últimas expediciones antes de abandonar Ecuador en Diciembre de 1859.

La fechas de colecta de *Pristimantis conspicillatus* para restringir la localidad donde fue colectada son inciertas. Sin embargo el prólogo del catalogo *Batrachia Salienta in the Collection of the British Museum* está firmado con fecha del primero de julio de 1858 por lo tanto la colecta de *P. conspicillatus* tiene que haber sido en la primera expedición de Fraser en Ecuador (Cuenca-Gualaquiza-Zamora).

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Teresa Camacho Badani, pasaporte 5295251 autor del trabajo de graduación titulado “Sistemática del complejo de especies *Pristimantis conspicillatus* y *Pristimantis Peruvianus* (Anura, Craugastoridae) ”, previa a la obtención del grado académico de MAGISTER EN BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

- 1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
- 2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 26 de Abril del 2013

Biol. Teresa Camacho Badani

Pasaporte 5295251